Nichtsymbiotische Fixierung des Luftstickstoffs durch *Pisum sativum* L. und *Zea Mays* L. unter dem Einfluss von Cyanocobalamin (Vitamin B_{12})

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Ernst Peter Müller

aus Muhen (Aargau)

1962

Büchler + Co AG Wabern-Bern • 1963

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der Herren Professoren

Dr. Max Geiger-Huber
und
Dr. Heinrich Zoller

Basel, den 6. November 1962

Prof. Dr. Martin Eichler
Dekan

Separatabdruck aus «Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft»
1963, Band 73
(Als Sonderdruck ausgegeben am 18. November 1963)

Nichtsymbiotische Fixierung des Luftstickstoffs durch *Pisum sativum* L. und *Zea Mays* L. unter dem Einfluss von Cyanocobalamin (Vitamin B_{12})

Von *Ernst Peter Müller*

Aus dem Botanischen Institut der Universität Basel

Manuskript eingegangen am 4. Juli 1963

Inhalt

Seite

Einleitung 347
Methode 351
Aseptische Aufzucht der Wurzelsysteme 351
Impfen der Versuchspflanzen 351
Sterilisation und Anwendung des Cyanocobalamins 352
Stickstoffbestimmung 352
Statistische Auswertung 353
Mikrobiologische Bestimmung des Vitamins B_{12} 354
Experimentelle Ergebnisse 356
Die Cyanocobalaminproduktion der Knöllchenbakterien 356
Die Wirkungslosigkeit von Cyanocobalamin auf das Wachstum der Knöllchenbakterien 360
Die Wirkung von Cyanocobalamin auf *Pisum sativum L.* 361
Konzentrationsänderungen des Cyanocobalamins in der Nährlösung 366
Die Wirkung von Cyanocobalamin auf *Zea Mays L.* 367
Diskussion 370
Zum methodischen Teil 370
Zu den Ergebnissen 370
Zusammenfassung 374
Literatur 376

Einleitung

Unter den Organismen oder Systemen, die den atmosphärischen Stickstoff zu fixieren vermögen, nimmt in der heutigen Forschung neben *Azotobacter* die Symbiose zwischen den Leguminosen und den Knöllchenbakterien eine Sonderstellung ein. Dafür ist die grosse praktische Bedeutung in der Agrikultur weitester Gebiete bestimmend, die früh erkannt und zu-

R. ENTV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

nutze gezogen (Vergil: Georgica I) und auch früh qualitativ und quantitativ zu erfassen versucht worden ist (Boussingault, 1838). Die merkwürdige Erscheinung der Wurzelknöllchen der Leguminosen, deren Funktion Hellriegel und Willfarth (1889) erkannt haben, stellt nach siebzig Jahren kontinuierlicher Forschung noch viele Probleme, die sich auf drei Hauptgebiete verteilen: die Infektion, die Knöllchenbildung und den Mechanismus der Assimilation atmosphärischen Stickstoffs. Erschwerend für die theoretische Abklärung dieser Assimilation ist der Umstand, dass der molekulare Stickstoff von inertem Charakter ist, so dass zum Reaktionsablauf offenbar ein ganz besonderes Enzymsystem notwendig ist.

Das von Kubo (1939) in den Wurzelknöllchen der Leguminosen gefundene Hämoprotein wurde von ihm selber für die Sauerstoffspeicherung und -übertragung verantwortlich gemacht. Virtanen (1945, 1947) und Virtanen und Laine (1946), die das Pigment ebenfalls fanden und untersuchten, ordneten ihm die Funktion der Stickstoffixierung zu. In verschiedenen Arbeiten wurde es in messbaren Zusammenhang mit dieser Reaktion gebracht (Keilin und Wang, 1945; Keilin und Smith, 1947; Virtanen und Laine, 1946; Niss und Wilson, 1947; Virtanen et al., 1947a, b). In der Folge konzentrierte sich das Interesse auf die Isolierung und Reindarstellung des nach Virtanen und Laine (1946) «Leghämoglobin» benannten Proteins (Ellfolk, 1959, 1960a, b). Leghämoglobin wird nur in der Symbiose gebildet (Keilin und Wang, 1945); weder in Rhizobien noch in Leguminosen allein wurde es je gefunden. Für weitere Informationen über Leghämoglobin kann auf die referierenden Arbeiten von Allen und Allen (1950, 1958) verwiesen werden.

Die Methodik beim Nachweis der Stickstoffaufnahme blieb auf Kjeldahlbestimmungen und manometrische Messungen beschränkt (und war dadurch verbunden mit einer gewissen Umständlichkeit und einem zu grossen «Auflösungsvermögen»), bis Burris et al. (1943) einen Apparat beschrieben, der die Anwendung des Isotops N^{15} erlaubte. Man verwendet bei dieser Methode abgeschnittene Knöllchen und setzt sie nur kurze Zeit – 1 bis 2 Stunden – der N^{15}-reichen Atmosphäre aus. Die dahinfallende Wartung der Versuchspflanzen und die bequeme Analyse erleichterten das Arbeiten, doch engte die Anordnung die Fragestellungen ein: Von der klassischen Stickstoffbestimmung wurde Abstand genommen, und hauptsächlich sind seither Geschwindigkeit und Intensität der Aufnahme in den Knöllchen verschiedenster Leguminosen gemessen worden (Aprison und Burris, 1952; Aprison et al., 1954; Magee und Burris, 1954, usw.). Weitere Nichtleguminosenknöllchen (Harris und Morrison, 1958; Morrison, 1961, usw.) und Mikroorganismen (Jensen und De Roma, 1959; Nemeth, 1959; Proctor und Wilson, 1958) gliederten sich den bekannten stickstoffixierenden Organismen an. Stevenson (1958) fand auch nichtknöllchentragende höhere Pflanzen als $N^{15}{}_2$-fixierend. Sie stellte

die Literatur über stickstoffixierende Böden zusammen und führte Experimente mit Pionierpflanzen durch, welche Luftstickstoff aufnahmen (Stevenson, 1959).

Burris et al. (1943) klärten die umstrittene Frage, ob *Rhizobium* in Reinkultur Stickstoff fixiere (Hopkins, 1929; Löhnis, 1930; Allison, 1930, und viele andere), nicht, da die festgestellte Akkumulation von N^{15} innerhalb der Fehlergrenzen der Methode lag. Immerhin bestätigten sie die Beobachtungen, dass neben *Azotobacter* und *Clostridium pasteurianum* auch blaugrüne Algen (Hérisset, 1946) den Luftstickstoff verwerten. Die Möglichkeit, den markierten Stickstoff in verschiedenen Fraktionen und Metaboliten nachzuweisen (Zelitch et al., 1952; Turchin, 1959; Bergersen, 1960), wird indessen der Aufklärung der Stickstoffixierung und -assimilierung viele neue Unterlagen liefern.

Wilson et al. (1933) hatten eine Abhängigkeit der Stickstoffaufnahme von der Kohlensäureassimilation festgestellt. Allison (1935) schrieb den Kohlenhydraten eine wesentliche Rolle bei der Symbiose zu. Nähere Beziehungen fanden Lindstrom et al. (1952). Mit dem Lichtgenuss der Pflanze hängt aber auch der Zustand des Knöllchenpigments (Virtanen, 1945) und seine Aktivität (Virtanen et al., 1955) zusammen. Pate (1958a, b) stellte entsprechende Beziehungen auf, indem er die Ausbildung der Knöllchen in Abhängigkeit von der Anzahl Blätter setzte. Bach et al. (1958) verglichen den C^{14}-Gehalt der organischen Säuren und der Aminosäuren in Wurzeln und Knöllchen am Tage mit dem Gehalt während der Nacht. Aus ihren Resultaten geht ebenfalls hervor, dass photosynthetische Produkte an der Luftstickstoffaufnahme der Knöllchen irgendwie beteiligt sind. An abgeschnittenen Knöllchen beobachteten sie eine bessere Fixierung bei Zugabe von Zuckern.

Die Beziehung zwischen Photosynthese und Stickstoffixierung wird auch bei *Rhodospirillum rubrum* festgestellt (Lindstrom et al., 1949, 1952; Kamen und Gest, 1949; Gest et al., 1950; Pratt und Frenkel, 1959).

Nicht leicht lassen sich die Vorgänge der Knöllchenbildung und der Aktivität trennen. Dass sich Variationen in der Belichtungsdauer auch auf die Zahl der Knöllchen auswirken, zeigte Rudin (1956). Raggio und Raggio (1956), dieselben mit Torrey (1957) und mit Burris (1959), konnten sogar an (infizierten) isolierten Leguminosenwurzeln Knöllchen entstehen lassen, wenn sie durch die Schnittfläche Inosit und verschiedene Wirkstoffe eindringen liessen.

Ausser Kohlenhydraten spielen bei der Fixation des Stickstoffs einige Spurenelemente eine Rolle, so Eisen, Molybdän, Vanadium und Wolfram (Nicholas, 1957).

Nachdem Holm-Hansen et al. (1954) Kobalt als für blaugrüne Algen essentiell erklärt und Ford und Hutner (1955) diese als B_{12} synthetisierend gefunden hatten, und mit der Kenntnis, dass die stickstoffbindenden Enzymsysteme bei *Nostoc*, *Azotobacter* und in den Knöllchen sehr ähnliche Eigenschaften haben (Burk und Burris, 1941; Burris und Wilson, 1945, 1946), ergaben sich für die symbiotische Fixierung neue Aspekte. Vitamin B_{12} wurde in den Knöllchen gesucht und gefunden, in viel geringerer Konzentration in den Leguminosenwurzeln und gar nicht in den oberirdischen Teilen (Duda et al., 1957). Lochhead und Thexton (1951, 1952) verwendeten es als Wachstumsfaktor für eine Anzahl Bodenbakterien, nachdem es Robbins et al. (1950) in Bodenextrakten und (nach ihrer Ansicht dorthin aus dem Boden diffundiert) in Nichtleguminosenwurzeln nachgewiesen hatten. Eine japanische Arbeit (Watanabe, 1950, 1959) zeigt, dass die stickstoffbindenden blaugrünen Algen das Wachstum und den Ertrag von Reis günstig beeinflussen, erwähnt die Tatsache jedoch nicht, dass diese Algen B_{12} synthetisieren.

Alle diese zunächst unzusammenhängend erscheinenden Beiträge unterstützten zu Beginn dieser Versuche folgende *Arbeitshypothese*: In Analogie zu den Funktionen der strukturell ähnlichen Hämine, Cytochrome und Chlorophylle könnte Vitamin B_{12}, oder allgemein ein Cobaltocorrinderivat, für die Aufnahme und eventuell für die Reduktion des Stickstoffmoleküls als Coenzym wirken.

Nach dieser Hypothese wäre die Funktion des Knöllchens, eine günstige Konzentration eines Cobamides im Kontakt mit dem pflanzlichen Gewebe zu erzeugen und aufrechtzuerhalten. Die Annahme, dass diese Bedingungen unter aseptischen Verhältnissen zur Stickstoffixierung durch die Leguminosen genügen, verlangte die Durchführung der zu beschreibenden Versuche. Die mit Leguminosen erzielten positiven Ergebnisse erlaubten eine Erweiterung der Hypothese in dem Sinne, dass auch Nichtleguminosen zur Stickstoffixierung befähigt wären, wenn ihre Wurzeln künstlich unter die physiologischen Bedingungen der Knöllchen gestellt würden. Über entsprechende Versuche wird ebenfalls hier berichtet.

Die hier gebrauchten Namen für Vitamin B_{12} und ähnliche Verbindungen sind die am Symposium 1956 in Hamburg von einer Kommission vorgeschlagenen (E. L. Smith, in Heinrich, 1957). Vitamin B_{12} ist synonym nur für Cyanocobalamin. Die Strukturformel dieses Moleküls kann der erwähnten Schrift oder der Monographie von E. L. Smith (1960) entnommen werden. Das Molekül besteht aus einem partiell hydrierten, porphyrinähnlichen Ringsystem (Corrin), das als Zentralatom Kobalt kovalent und koordinativ gebunden enthält (Cobaltocorrin). Das Ringsystem besitzt mehrere Methylgruppen und Säureamid-Seitenketten sowie vom Ring D zum zentralen Kobaltatom führend ein Nucleotid mit der Base Dimethylbenzimidazol und dem Zucker Ribose. Im weiteren ist eine Cyangruppe an das Kobalt gebunden, dem schliesslich eine einfach positive Ladung übrigbleibt (Cyanocobalamin). Das Cyanid kann durch andere Substituenten ersetzt werden: Hydroxocobalamin, Aquo-, Chloro-, Nitritocobalamin usw. ersetzen die alten Bezeichnungen mit den Indices zu B_{12}. Corphyrine sind biologisch aktive und inaktive Stoffe, Cobamide nur biologisch aktive.

Methode

Sowohl die qualitative als auch besonders die quantitative Erfassung eines symbiotischen Stoffwechselvorganges erfordern, dass die an der Symbiose beteiligten Organismen einzeln und in Gemeinschaft in definiertem Zustand vorliegen. Es waren demnach die Mikroorganismen (*Rhizobium leguminosarum* Frank, Stamm H 47) in Reinkultur, die höheren Pflanzen (*Pisum sativum* L., Sorte «Senator», und *Zea Mays* L., «Ungarischer Saatmais») mit sterilem Wurzelsystem zu ziehen. Als Versuchskriterien wurden einfache Grössen, nämlich Trockengewicht und totaler Stickstoffgehalt, bestimmt. Da bei der im folgenden zu beschreibenden Anordnung die Zahl der Individuen notgedrungen klein bleiben musste – nur zirka 1% des Samengutes lieferte verwendbare Versuchsobjekte –, wurden die Ergebnisse stets mittels des t-Tests (siehe Seite 354) verglichen.

Aseptische Aufzucht der Wurzelsysteme

Wegleitend für die Aufzucht der Versuchspflanzen waren drei am hiesigen Institut durchgeführte Arbeiten: Die Erbsensamen bzw. Maiskaryopsen wurden nach Burlet (1940) erlesen, benetzbar gemacht, desinfiziert und aseptisch gequollen, keimten in 7 bzw. 4 Tagen auf Keimröhrchen (Rudin, 1956, Seite 59) im dunklen Thermostaten bei 28 °C und wurden dann aseptisch auf Fernbachkolben gesetzt, die 200 ml niederschlagsarme, stickstofffreie Nährlösung (Bürgin-Wolff, 1959, Seite 79ff.) enthielten. Die Kolben wurden mit einer Aluminiumfolie umwickelt. Alle Manipulationen und Operationen an der Pflanze in der Zeit zwischen Desinfektion und Abbruch – also das Setzen der Samen auf Keimröhrchen und der kräftigsten Keimlinge auf Fernbachkolben, Zugaben zur Nährlösung sowie das Abschneiden der Cotyledonen – wurden in der keimfreien Impfkammer unter Verwendung sterilisierter Überkleider und Geräte durchgeführt. Im klimatisierten Gewächshaus wurden hohe Luftfeuchtigkeit, eine durchschnittliche, wenig schwankende Temperatur von 20 °C sowie in den Wintermonaten durch Zusatzbeleuchtung (Neon-Tageslicht) eine Tageslänge von 14 Stunden eingehalten.

Impfen der Versuchspflanzen

Die Rhizobien wurden auf neutralem Hefe-Mannit-Agar (Rudin, 1956) in Kolleschalen kultiviert, die 7 Tage bei 23 bis 25 °C im Dunkeln gehalten wurden. Mit sterilem Leitungswasser wurden je Schale 15 bis 20 ml einer Bakteriensuspension hergestellt und diese den Nährlösungen der Versuchspflanzen in Portionen von 3 ml mit je einer eigenen Pipette aseptisch zugefügt. Dieser Vorgang wird hier als «Impfen» bezeichnet.

Sterilisation und Anwendung des Cyanocobalamins

Das Cyanocobalamin wurde von der Firma *Hoffmann-La Roche* in *Basel* in Ampullen von 0,01 g bezogen. Der Inhalt wurde in etwa 400 ml sterilem Wasser gelöst, die Lösung nach Angaben der Firma 15 min bei 110 °C autoklaviert und nachher aseptisch auf 500 ml aufgefüllt. Die so erhaltene Stammlösung von 20 γ/ml bewahrte man im dunkeln Kühlschrank auf und verwarf, was davon binnen 4 Wochen keine Verwendung gefunden hatte. Bei Bedarf stellte man aseptisch Verdünnungen her, so dass die Cobalaminlösungen stets in Portionen von 1 bis 2 ml mittels einer sterilen, 20 ml fassenden Injektionsspritze den Nährlösungen der Pflanzen zugefügt werden konnten.

Frost et al. (1952) und andere Autoren geben an, dass Cyanocobalamin in neutraler und schwach saurer Lösung wesentlich hitzebeständiger und länger haltbar ist. Auch eigene Messungen zeigten, dass die Extinktion bei 361 mμ über mehrere Wochen gleich blieb. (Diese Wellenlänge wurde einem zuvor aufgenommenen Absorptionsspektrum entnommen.) Dennoch wurden stets neue Lösungen hergestellt, so dass die Konstanz der Versuchsbedingungen auch in dieser Hinsicht gewahrt blieb.

Stickstoffbestimmung

Die von anhaftender Nährlösung befreiten, zerkleinerten und bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Pflanzen wurden je nach mittlerem Trockengewicht, pro Versuch aber einheitlich, mit 2 bis 5 ml konzentrierter analysenreiner Schwefelsäure unter Zusatz einer Spatelspitze Katalysator (1 Teil Kupfersulfat + 3 Teile Kaliumsulfat) in 50 ml fassenden Kjeldahlkölbchen einzeln verascht. Nach mehrmaligem Zutropfen von reinem 30%-Wasserstoffsuperoxyd war die Umsetzung nach 30 bis 45 min beendet (Lieb, in Klein, 1931).

Von den auf 20 ml verdünnten Proben gelangten meistens 2 ml in der Mikrokjeldahlapparatur nach Parnas und Wagner (Parnas, 1938) zur Stickstoffbestimmung. Die Destillation dauerte 7 min. Als Vorlage dienten 10 oder 15 ml 0,01n Salzsäure, die dann mit 0,01n Natronlauge gegen Methylrot titriert wurden. Die als Ammonium-Ion vorliegende Menge Stickstoff wurde aus dem Verbrauch an Natronlauge graphisch ermittelt.

Die Methode wurde in dieser Weise ausgearbeitet, damit mehrere für die ganze Pflanze repräsentative Proben resultierten, die stichprobenweise mehrmals überprüft werden konnten, und um den apparativen und zeitlichen Aufwand in vernünftigen Grenzen zu halten. Wiederholt durchgeführte Analysen von Ammonsulfat waren mit einem maximalen Fehler von ± 1% behaftet; Proben veraschter Aminosäuren lieferten im gleichen

Masse verlässliche Werte. Ebensogross sind auch die grössten Abweichungen mehrerer Analysenwerte ein und derselben Pflanze vom Mittelwert (Tabelle 1).

Tabelle 1

Genauigkeit der Stickstoffbestimmung. Das Ammoniumsulfat bzw. die veraschten organischen Substanzen wurden zu 100 ml gelöst. Bestimmt wurde 1 ml

Analysensubstanz	Einwaage mg	Analyse mg	Stickstoff		Abweichung %
			Sollwert mg	bestimmt mg	
(Blindprobe)	—	—	0	0,00	0
Ammonsulfat	680	6,80	1,44	1,425	—1
				1,430	—0,75
				1,430	—0,75
Glycin	622	6,22	1,16	1,165	+0,5
				1,175	+1,5
				1,170	+1
Alanin	559	5,59	0,88	0,880	0
				0,870	—1
				0,885	+0,5
Erbsenspross	362	18,1	1,141[1]	1,135	—0,5
				1,145	+0,5
				1,150	+1,0
				1,135	—0,5

[1] Mittelwert

Statistische Auswertung

Es war zu erwarten, dass unter den gegebenen Bedingungen die Serienmittelwerte der Trockengewichte und Stickstoffgehalte nicht stark voneinander abwichen. Unkontrollierbare Einflüsse, wie Standort der Versuchspflanze oder Zeitpunkt der Stickstoffbestimmung innerhalb einer grossen Reihe, hätten leicht überlagernde Effekte erzeugen können. Daher wurde streng darauf geachtet, dass kein «Gang» auftreten konnte: Die Bildung der Versuchsserien war dem Zufall überlassen; nach dem Setzen auf Fernbachkolben wurde also keine Auswahl mehr getroffen. Zeitliche und räumliche «ideale Unordnung» wurde überall beobachtet, nämlich bei der Aufstellung im Gewächshaus, beim Impfen und ähnlichen Vorgängen,

beim Abbruch und bei der Stickstoffbestimmung, wo zur Vermeidung psychischer Einflüsse die Proben in verschlüsselter Numerierung vorlagen.

Die Mittelwerte $\bar{x}$ mit den angegebenen Streuungen $\pm s$ ergeben sich aus den Einzelwerten x_i durch die Formeln

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \ldots + x_n}{n}$$

und

$$s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n \cdot (n-1)}},$$

wobei n die Anzahl Versuchseinheiten pro Serie ist. Ab und zu traten unwahrscheinliche Extremwerte auf, die dann ausgeschieden wurden, wenn die Grösse $\frac{|x - \bar{x}|}{s}$ das Dreifache des hiefür tabellierten Wertes überstieg. (Siehe «Chauvenets Kriterium», in Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen 1955, Seite 43.)

Die Signifikanzen der Unterschiede wurden durch den t-Test (Fisher, 1945; Fisher und Yates, 1948) ermittelt. Sie sind ausgedrückt durch den Wert P, der sich zwischen 0 und 1 bewegt, was den Irrtumswahrscheinlichkeiten 0 bis 100 % entspricht. P beschreibt die Abweichung gegenüber der Kontrollserie. Die wirklichen Werte sind stets kleiner als das P der Tabelle.

Mikrobiologische Bestimmung des Vitamins B_{12}

Den gegebenen apparativen Verhältnissen wurde die Versuchsanordnung von Thölen und Pletscher (1953) angepasst. Als Testorganismus diente *Euglena gracilis* var. *bacillaris*.

Euglena wurde auf Schrägagar 6 bis 7 Tage bei 29 bis 30 °C unter ständiger Belichtung angezüchtet. Als Nährmedium brauchte man Difco-Medium, B_{12}-frei, für Untersuchungen mit *Ochromonas malhamensis*[1], unter Zugabe von 0,5 mγ Cyanocobalamin pro ml.

Die Difco-Lösungen wurden mit im Ionenaustauscher entsalztem Wasser, das zur B_{12}-Zerstörung mindestens 2 Stunden unter 1 atü autoklaviert worden war, unter aseptischen Verhältnissen hergestellt und hernach bei 121 °C 10 min sterilisiert. Dann wurde das sterile Cyanocobalamin zupipettiert.

---

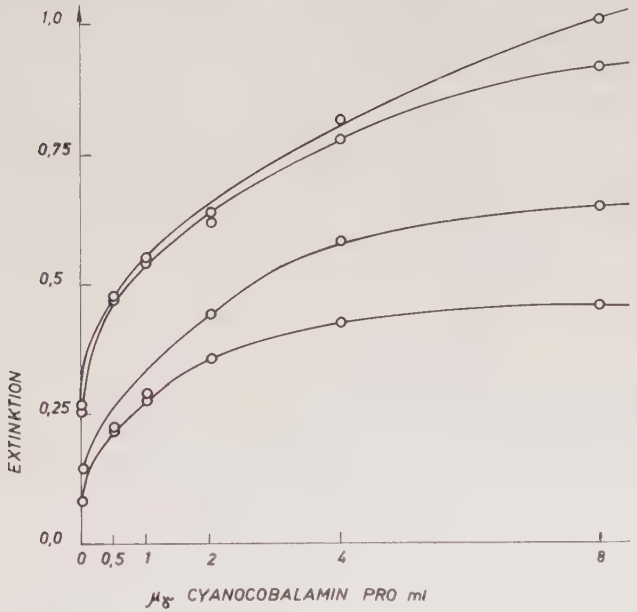
[1] Dieser anfänglich verwendete Testorganismus erwies sich als für unsere Versuchszwecke wenig geeignet.

Die Impflösung enthielt 5 $\mu\gamma$ Cyanocobalamin pro ml. Sie wurde in Kulturröhrchen zu je 10 ml 7 Tage bei 29 bis 30 °C unter steter Belichtung bebrütet. Die Teströhrchen enthielten je 4 ml und wurden wie die Impflösung behandelt.

Der Versuchsraum wurde durch Berieselung eines Vorhanges feucht gehalten. Die Teströhrchen (zirka 15 cm lange Kulturröhrchen) wurden auf einem Drahtgitter leicht schräg gestellt, so dass Belichtung mit Neonlampen von oben und unten möglich war.

Nach 7 Tagen wurden die Algen abzentrifugiert und gewaschen. Die Zellen wurden mit Scoth-Light-Glasperlen und einem Glasstab zermahlen und das austretende Chlorophyll in Methanol aufgenommen; zweimaliges Extrahieren genügte. Das Absorptionsspektrum eines solchen Extraktes weist bei 435 mμ ein markantes Maximum auf, so dass die Proben bei dieser Wellenlänge gemessen wurden. Zur Verwendung gelangte meist ein Beckman-, einmal ein Unicam-Spektrophotometer.

Der Extinktionsmittelwert mindestens dreier gleicher Proben konnte, da die Streuung klein war, ebenfalls erhalten werden nach dem Zusammen-



Figur 1

Euglena gracilis var. *bacillaris*. Vitamin-B_{12}-Test. Die einzelnen Kurven wurden zu verschiedenen Zeiten erhalten; ihre Steigungen hängen hauptsächlich vom Inoculum ab.

giessen der Kulturlösungen vor dem Zentrifugieren. Über die Verlässlichkeit der beschriebenen Bestimmungsmethode geben verschiedene Kurven in Figur 1 Aufschluss.

Experimentelle Ergebnisse

Im Abschnitt «Methode» ist der zeitliche Verlauf der aseptischen Aufzucht dargestellt. Bis zum Tage, da die Keimlinge auf Fernbachkolben gesetzt wurden, blieb das Procedere stets gleich. Dieser Tag wird in den im folgenden beschriebenen Versuchen als zeitlicher Nullpunkt gesetzt: Der Keimling wird ab hier Pflanze genannt, und die Versuchstage werden von hier an gezählt.

Die Konzentrationen der angewandten Reagenzien werden in Gewicht pro Milliliter angegeben. Wir verwenden die Bezeichnungen γ für 10^{-6} g, mγ für 10^{-9} g und $\mu\gamma$ für 10^{-12} g. 1 γ/ml ist demnach 1 p.p.m., 1 mγ/ml ist 1 p.p.b. und 1 $\mu\gamma$/ml ist 1 p.p.t.

Als anorganisches Kobalt wurde $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (Merck) verwendet. Der übliche Zusatz Hoaglandscher A–Z-Lösung ergibt eine Grundkonzentration von 55 mγ Kobaltchlorid pro ml, was 21 mγ Co^{+2}/ml entspricht. 1 mγ Cyanocobalamin (Hoffmann-La Roche) mit der Bruttoformel $C_{63}H_{90}N_{14}PCo$ und dem Formelgewicht 1357 entspricht 43 $\mu\gamma$ Co. Der Stickstoffanteil dieser Verbindung ist im Falle ihrer höchsten Konzentration geringer als der tausendste Teil dessen, was eine vollständige Nährlösung an anorganisch gebundenem Stickstoff enthält. Er kann, auch bei vollständiger Aufnahme, die Bilanz nicht beeinflussen.

Es sei nochmals festgehalten, dass eine stickstofffreie Nährlösung verwendet wurde. Das Wasser und die Reagenzien waren nicht von Kobaltspuren befreit, hingegen enthielt die A–Z-Lösung keine Nitrate.

Die Cyanocobalaminproduktion der Knöllchenbakterien

Es bestehen grundsätzlich drei Möglichkeiten für die Bildung von Vitamin B_{12} in den Knöllchen: 1. ist es denkbar, dass es von der höheren Pflanze allein produziert wird, 2. kann es durch die Rhizobien allein gebildet werden, und 3. könnte es,wie das Leghämoglobin, nur bei der Symbiose entstehen.

Zur *ersten* Auffassung nimmt Darken (1953), die über 150 diesbezügliche Zitate zusammentrug, in negativem Sinne Stellung. Duda et al. (1957) fanden den grössten B_{12}-Gehalt in den Knöllchen, viel weniger in den Wurzeln und überhaupt nichts in den Blättern verschiedener Leguminosen, was ebenfalls gegen die erste Ansicht spricht. Fries (1962)

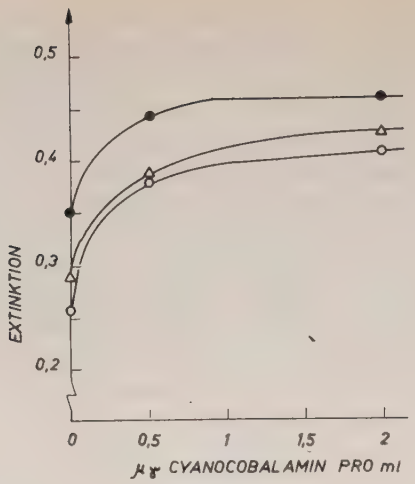
findet das Vitamin zwar in Extrakten total aseptisch gezogener *Pisum*-Pflanzen schon nach 12 bzw. 20 Tagen. Leider gibt sie aber weder Vergleichszahlen für die verwendeten Nährböden (White's culture medium) noch für die Erbsensamen, in die doch schon in der Vorgeneration «auf unsterilem Wege» Cobalamine gelangt sein können. Wahrscheinlicher ist schon die *zweite* Annahme: Burton und Lochhead (1952) fanden bei 70 Stämmen, besonders stark bei den Stämmen von *Rhizobium meliloti*, B_{12}-Bildung. Ihren Kulturmedien mussten sie aber ausser Glucose Hefeextrakt und Aminosäuren beifügen. Auch nach Malinska und Pedziwilk (1958) werden durch isolierte Klee-Rhizobien Cobalamine gebildet; ihre Nährböden enthielten aber Leguminosenextrakt. Die *dritte* Hypothese dürfte die zutreffende sein, indem die nicht erfassten Stoffe der erwähnten Extrakte durch die Leguminosenpflanze geliefert und bei der Synthese des Cobalaminmoleküls verwendet würden.

Dabei sei ausser acht gelassen, wo diese Synthese in Wirklichkeit stattfindet, ob am Ort der höchsten Konzentration, also im Knöllchen, ob in einem oder verschiedenen anderen Organen der Pflanze oder endlich gar in den Bakterien.

Nimmt man an, dass statt der Leguminosenpflanze irgendein anderer photosynthetischer Organismus, etwa eine Alge, genüge, den Teil des Moleküls zu liefern, den zu synthetisieren die Bakterien nicht imstande sind, so ist damit eine Versuchsanordnung gegeben, wie sie im folgenden beschrieben wird.

Zu *Euglena*-Teströhrchen wurde ausser verschiedenen Mengen von Vitamin B_{12} je ein Tropfen einer Rhizobiensuspension gefügt, die durch Abheben der Bakterien von einem Hefe-Mannit-Agar hergestellt worden war. Für jede Vitaminkonzentration verwendete man 4 Röhrchen. Die Versuchsbedingungen waren die auf Seite 354 angegebenen. Da der Kurvenverlauf für die Kontrollserie bekannt war (siehe Figur 1), konnte man sich mit 3 verschiedenen Konzentrationen begnügen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Figuren 2 und 3 dargestellt.

Im ersten Versuch (Figur 2) wurde die Cobalaminproduktion relativ *alter* Rhizobien geprüft. Die unterste Kurve (Kontrollkurve) stellt die Abhängigkeit der Chlorophyllmenge von der Cyanocobalaminkonzentration dar. Erhielten nun die Röhrchen gleichzeitig mit dem Cyanocobalamin einen Tropfen Rhizobiensuspension, so resultierte die oberste Kurve. Sie liegt bedeutend höher als die Kontrollkurve, was anzeigt, dass entweder mit der Rhizobiensuspension schon Cobalamin zugetropft oder, was bei der geringen Dichte dieser Suspension wahrscheinlicher ist, dass in dieser Anordnung Cobalamin produziert worden ist. Die mittlere Kurve wurde so erhalten, dass man unbeimpfte Hefe-Mannit-Agarplatten mit sterilem Wasser abspülte und den Röhrchen einer zweiten Serie an Stelle der Sus-



Figur 2

Produktion von Vitamin B_{12} durch *Rhizobium leguminosarum* in Mischkultur mit *Euglena gracilis*. Rhizobien-Impfsuspension ab *alter* Reinkultur (28 Tage)

Unicam-Spektrophotometer, $\lambda = 435$ mμ

○ *Euglena* allein (Kontrollkurve)

● *Euglena* mit *Rhizobium*

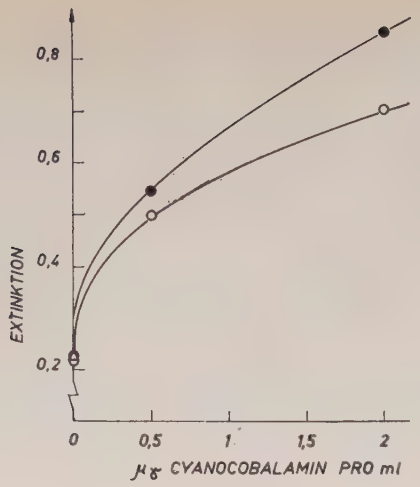
△ *Euglena* mit Spülwasser von Hefe-Mannit-Agar

pension je einen Tropfen dieses Spülwassers zugab. Die Werte liegen nur unbedeutend höher als die der Kontrollserie, was anzeigt, dass das Nährsubstrat der Rhizobien (annähernd) cobalaminfrei war.

Im zweiten Versuch (Figur 3) wurde die Cobalaminproduktion relativ *junger* Rhizobien geprüft; die Anordnung entspricht dem ersten. Bei vollständigem Fehlen von Cyanocobalamin in der Nährlösung wird auch durch die Rhizobien keines gebildet. Durch eine geringe Anfangskonzentration kann die Synthese jedoch eingeleitet werden: Bei anfänglich 0,5 $\mu\gamma$ B_{12}/ml findet man einen Wert, der, auf der Kontrollkurve abgelesen, ungefähr 0,8 $\mu\gamma$ entspricht. Dieser Wert gilt unter der Annahme, dass das Cobalamin nur zu Beginn des Versuchs und nur dann gebildet wurde. Da sich die Produktion wohl über die ganze Versuchsdauer verteilt, jedoch in unkontrollierter Weise, ist ein quantitativer Vergleich mit der Kontrollkurve nur bedingt richtig.

Weder in diesen Mischkulturen (Figur 4) noch im verwendeten B_{12}-freien Difco-Medium allein vermehrten sich die Rhizobien je sichtbar.

Es darf angenommen werden, dass der Hefe-Mannit-Agar kein Cobalamin enthält, dass aber *Rhizobium leguminosarum* solches zu produzieren



Figur 3

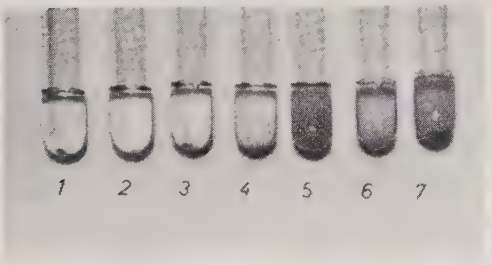
Produktion von Vitamin B_{12} durch *Rhizobium leguminosarum* in Mischkultur mit *Euglena gracilis*. Rhizobien-Impfsuspension ab *junger* Reinkultur (10 Tage)

Beckman-Spektrophotometer, $\lambda = 435$ mμ

○ *Euglena* allein (Kontrollkurve)

● *Euglena* mit *Rhizobium*

△ *Euglena* mit Spülwasser von Hefe-Mannit-Agar (nur 1 Wert bei 0 mγ Cyanocobalamin)



Figur 4

Euglena-Teströhrchen, aufgeschüttelt, vor der Chlorophyllbestimmung

1 ohne Cyanocobalamin

2 ohne Cyanocobalamin, mit *Rhizobium*

3 ohne Cyanocobalamin, mit Spülwasser von Hefe-Mannit-Agar

4 0,5 $\mu\gamma$ Cyanocobalamin pro ml

5 0,5 $\mu\gamma$ Cyanocobalamin pro ml, mit *Rhizobium*

6 2,0 $\mu\gamma$ Cyanocobalamin pro ml

7 2,0 $\mu\gamma$ Cyanocobalamin pro ml, mit *Rhizobium*

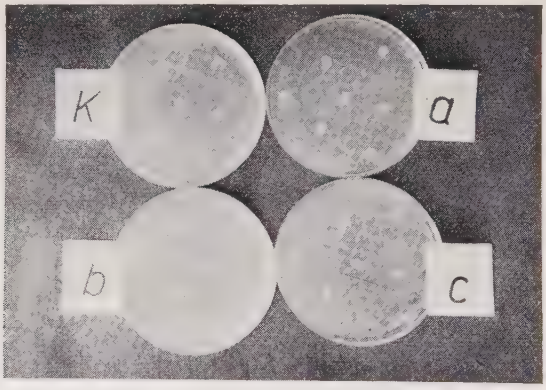
Vergleiche Figur 3

vermag in Anwesenheit von *Euglena gracilis*, und zwar umso mehr, je älter die Rhizobienkultur ist oder je stärker man die Synthese durch Cobalaminzugaben stimuliert (Autokatalysierung).

Die Wirkungslosigkeit von Cyanocobalamin auf das Wachstum der Knöllchenbakterien

Es wurde oben gezeigt, dass *Rhizobium leguminosarum* in Vergesellschaftung mit einem photosynthetischen Organismus Vitamin B_{12} produziert. Wäre dieses Vitamin für die Knöllchenbakterien selber ein Wuchsstoff, so müssten sie sich in den Knöllchen in einem Masse vermehren, mit dem die Entwicklung des Tumorgewebes nicht Schritt hielte. Es ist deshalb nicht zu erwarten, dass im Falle der Symbiose das Cobalamin die Rhizobienvermehrung bewirkt und dass sekundär erst diese Vermehrung den Stickstoffgewinn in der Pflanze verursacht. Eine weitere Versuchsanordnung bestätigte diese Ansicht:

Auf Hefe-Mannit-Agar wuchs *Rhizobium leguminosarum* immer gut innerhalb einer Woche bei 23 °C, dank einer unbekannten Komponente des Hefeextraktes. Diese Komponente kann aber aus den oben angestellten Erwägungen nicht Vitamin B_{12} sein. Es war daher von Interesse, festzustellen, ob Cyanocobalamin den frischen Bäckerhefeextrakt tatsächlich nicht zu ersetzen vermag.



Figur 5

Rhizobium leguminosarum. Die Wirkungslosigkeit von Cyanocobalamin auf das Wachstum der Reinkultur. Mannitagar ohne Hefeextrakt. 6 Wochen alte Kulturen

K		Kontrolle ohne Cyanocobalamin
a		0,05 mγ Cyanocobalamin pro ml
b	5	mγ Cyanocobalamin pro ml
c	500	mγ Cyanocobalamin pro ml

Sechs Platten mit dem stets verwendeten Nährboden, jedoch ohne Hefeextrakt, wurden versehen mit 0, 0,05, 0,5, 5, 50 und 500 mγ Cyanocobalamin pro ml. Auf jede Platte wurden mittels einer fein ausgezogenen Pipette von einer dünnen Rhizobiensuspension 7 Tröpfchen getupft. Die Platten wurden, wie üblich, bei 23 °C im dunklen Thermostaten aufbewahrt. Nach etwa 10 Tagen begann das Wachstum auf allen Platten, und nach 6 Wochen hatten sich die Impfstellen zu kreisrunden Kulturen von 6 bis 8 mm Durchmesser entwickelt (Figur 5). In keiner der angewandten Konzentrationen bewirkte das Cyanocobalamin eine makroskopische oder mikroskopische Veränderung der Kulturen gegenüber der Kontrolle, die als B_{12}-frei gelten konnte (siehe Seite 358).

Die Funktion des Vitamins B_{12} in den Knöllchen kann also nicht darin bestehen, die Rhizobien zur Vermehrung anzuregen.

Die Wirkung von Cyanocobalamin auf Pisum sativum L.

Vorversuche ergaben, dass bei sorgfältiger Aufzucht 8 Pflanzen pro Serie genügten, um die Streuung der Mittelwerte unter 10 % zu bringen, was für den Signifikanznachweis kleiner Unterschiede unbedingt erforderlich war.

In Anlehnung an verschiedene Literaturwerte für die Konzentration von Vitamin B_{12} in physiologischen Systemen wurde das Cyanocobalamin von 0 bis 500 mγ/ml angewandt.

Bei einer Konzentrationsreihe mit den Werten 0, 50, 150, 300 und 450 mγ B_{12}/ml zeigte sich, dass aseptisch gezogene Erbsenpflanzen, denen am 8. Tage bei gleichzeitiger Zugabe des Vitamins die Cotyledonen amputiert worden waren, mit einem deutlichen Anstieg von Trockengewicht und Stickstoffgehalt reagierten (Tabelle 2). Dabei genügte schon ein B_{12}-Zusatz von 50 mγ/ml, um 20 % Stickstoffgewinn zu erzielen. Der relative

Tabelle 2

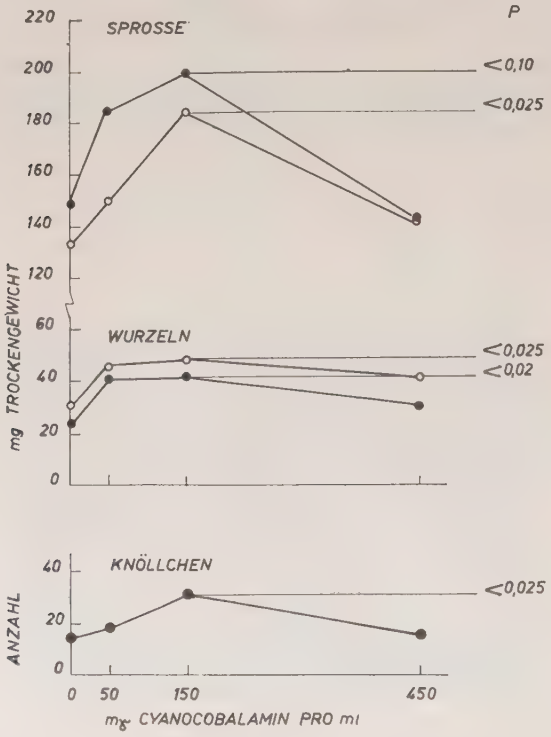
Pisum sativum. Trockengewicht und Stickstoffgehalt von 26tägigen Pflanzen nach Zugabe von verschiedenen Mengen Cyanocobalamin zur stickstofffreien Nährlösung am 8. Tag

Serie	Cobalamin mγ/ml	n	Trockengewicht			P	Stickstoff			P
			mg	±s	%		mg	±s	%	
1	0	10	234	17	100	—	5,3	0,3	100	—
2	50	10	238	17	121	0,10	6,2	0,3	117	0,05
3	150	9	278	11	119	0,20	6,0	0,3	113	0,20
4	300	10	254	20	109		5,6	0,3	106	
5	450	9	257	19	110		5,5	0,5	104	

Stickstoffgehalt betrug 2,2 bis 2,4 %. Bei gleicher Anordnung beobachtete man im übrigen 3,1 bis 3,9 % Stickstoff, wenn die Cotyledonen erst vor dem Trocknen der Pflanzen abgeschnitten wurden. Jedoch konnte dann keine Wirkung des Cyanocobalamins mehr festgestellt werden.

Um den Pflanzen einen möglichst grossen Stickstoffhunger aufzuzwingen, wurden die Cotyledonen nun immer entfernt, jedoch frühestens am 8. Tage, damit keine Chlorose auftrat, und unter der Annahme, dass zuvor Enzyme aus ihnen mobilisiert werden müssen.

In einem anderen Versuch wurde die Trockengewichtszunahme bei unbeimpften Pflanzen verglichen mit beimpften, knöllchentragenden. Das Cobalamin und die Rhizobiensuspension wurden am 8. Tag zupipettiert. Gleichzeitig wurden die Cotyledonen abgeschnitten. Vor dem Trock-



Figur 6

Pisum sativum. Knöllchenzahl und Trockengewicht von totalen Pflanzen nach 5 Wochen aseptischer Kultur auf stickstofffreier Nährlösung. Zugabe des Cyanocobalamins nach 1 Woche

●——● beimpfte Pflanzen

○——○ unbeimpfte Pflanzen (keine Knöllchen)

nen wurden die Wurzeln von den Knöllchen befreit. Die Serien umfassten je 8 Pflanzen. Figur 6 zeigt, dass sowohl bei aseptisch gezogenen wie bei beimpften Erbsen das Trockengewicht bei Zugabe von Cyanocobalamin steigt. Dabei liegen die Werte der Sprosstrockengewichte höher bei beimpften als bei aseptischen Pflanzen, die Wurzeltrockengewichte (ohne Knöllchen) jedoch tiefer. Bei 150 mγ B_{12}/ml stieg die Knöllchenzahl auf den doppelten Wert der Kontrolle[1]. Die serienweise durchgeführten Analysen ergaben gleichen prozentualen Stickstoffgehalt für alle Serien (2,7 bis 2,8%, bezogen auf das Trockengewicht), so dass bei 150 mγ B_{12}/ml mit einem der Trockengewichtszunahme parallelgehenden Stickstoffgewinn von etwa 30% gerechnet werden konnte.

In einem weiteren gleich angeordneten Versuch wurden die Einzelwerte bestimmt. Für aseptisch kultivierte Pflanzen konnte bei 50 und 300 mγ B_{12}/ml ein Stickstoffanstieg von 34 bzw. 36% beobachtet werden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von P = 0,025 bzw. 0,05. Die knöllchentragenden Pflanzen erreichten schwach höhere Werte als die entsprechenden aseptischen (8,8 statt 8,2 mg, 8,6 statt 8,3 mg). Auf B_{12}-freier Lösung gewachsen, enthielten sie 7,5 mg, die aseptischen 6,1 mg Stickstoff. Dies entspricht einem Unterschied von 23%.

In der beschriebenen Versuchsanordnung vermag die Pflanze einerseits den Stickstoff aus den Reserven der Cotyledonen zu beziehen, andererseits muss der darüber hinaus gefundene aus der Luft über die Nährlösungsphase aufgenommen worden sein. Den beimpften Pflanzen standen für diese Aufnahme allerdings noch die Knöllchen zur Verfügung; bei den aseptisch gezogenen aber muss das zugefügte Cyanocobalamin bei der Fixierung eine Rolle gespielt haben, ohne dass dabei je ein spezifisches Tumorgewebe an den Wurzeln auftrat.

In zwei grösseren Versuchen wurden die bisher gewonnenen Kenntnisse überprüft und miteinander verglichen. Jeder dieser Versuche umfasste 120 Pflanzen, nämlich 4 Gruppen zu 3 Serien mit je 10 Einheiten. Die einzelnen Gruppen wurden entweder nie, nach einer oder nach zwei Wochen mit Cyanocobalamin (50 mγ/ml) bzw. mit einer Rhizobiensuspension versehen. Innerhalb der Gruppen wurden den Pflanzen der einzelnen Serien nach 1, 2, 3 oder 5 Wochen (in diesem Falle also unmittelbar vor dem Trocknen) die Cotyledonen abgeschnitten. Tabellen 3 und 4 zeigen, dass sowohl das Cobalamin wie die Rhizobiensuspension wirksamer waren, wenn sie erst nach zwei Wochen appliziert wurden, und zwar wurden die grössten Differenzen zur Kontrolle erreicht, wenn man die Cotyledonen schon nach einer Woche amputiert hatte. Da die beiden Versuche nicht

[1] Der Grad der Signifikanz der Unterschiede (P) zwischen den Maximalwerten bei 150 mγ B_{12}/ml und den Kontrollwerten mit 0 mγ B_{12}/ml ist in der Figur eingetragen.

Tabelle 3

Pisum sativum. Trockengewicht und Stickstoffgehalt von 5 Wochen alten Pflanzen nach Zugabe von 50 mγ Cyanocobalamin pro ml stickstofffreier Nährlösung zu verschiedenen Zeitpunkten. Alter der Pflanzen in Wochen
A: beim Abschneiden der Cotyledonen
B: bei der Cobalaminzugabe

A	B	Trockengewicht				Stickstoff				
		n	mg	±s	%	n	mg	±s	%	P
1	—[1]	9	236	14	100	9	5,0	0,2	*100*	—
1	1	10	236	11	100	9	5,5	0,3	110	0,20
1	*2*	9	238	12	101	9	5,7	0,2	*114*	*0,02*
2	—	10	314	29	134	10	7,8	0,5	156	
2	1	10	297	25	126	8	6,9	0,3	138	
2	2	9	269	25	114	10	7,4	0,6	148	
3	—	10	299	23	126	10	7,3	0,2	146	
3	1	10	255	24	108	10	7,3	0,5	146	
3	2	9	303	20	128	9	7,5	0,5	144	
5	—	10	306	20	130	10	7,5	0,6	150	
5	1	10	241	21	103	10	6,3	0,6	126	
5	2	10	287	31	122	9	7,2	0,5	144	

[1] bedeutet: keine Cobalaminzugabe

gleichzeitig hatten angesetzt werden können (mit 120 Pflanzen war die maximale Anzahl, die in einem Tag noch bewältigt werden konnte, erreicht), dürfen die entsprechenden Serienabsolutwerte nicht miteinander verglichen werden. Trockengewicht und Stickstoffgehalt, auf 100 bezogen, zeigen bei beiden Versuchen einen ähnlichen Verlauf. Die Werte der knöllchentragenden Erbsenpflanzen liegen nur unbedeutend höher als die der aseptischen, aber mit Cobalamin versehenen.

Mit den optimalen Bedingungen dieser Versuche (Cotyledonen nach 1 Woche weg, Cobalaminzugabe nach 2 Wochen) wurden nun je 15 Erbsenpflanzen ohne und 15 mit 100 mγ Cyanocobalamin pro ml 3, 4, 5 und 6 Wochen aseptisch gezogen und dann auf Trockengewicht und Stickstoffgehalt untersucht. Damit die Pflanzen gleichzeitig abgebrochen und gewogen werden konnten, wurden sie gestaffelt gesetzt. Die Resultate sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

Tabelle 4

Pisum sativum. Trockengewicht und Stickstoffgehalt von 5 Wochen alten Pflanzen nach Beimpfen mit *Rhizobium leguminosarum* zu verschiedenen Zeitpunkten. Alter der Pflanzen in Wochen

A: beim Abschneiden der Cotyledonen

B: beim Beimpfen

A	B	Knöllchen		Trockengewicht				Stickstoff				
		n	Zahl ±s	n	mg	±s	%	n	mg	±s	%	P
1	—[1]	10	0	9	167	12	100	9	5,5	0,2	*100*	—
1	1	10	12±2	10	160	13	96	9	6,6	0,4	120	0,025
1	*2*	10	39±6	10	183	16	107	9	6,9	0,5	*125*	*0,025*
2	—	10	0	8	173	10	104	9	6,5	0,3	118	
2	1	10	14 ±4	10	180	16	108	10	7,3	0,6	133	
2	2	10	34±5	10	189	12	113	10	7,5	0,3	136	
3	—	10	0	9	187	16	112	8	7,2	0,7	131	
3	1	10	21 ±5	8	188	13	112	8	8,2	0,5	149	
3	2	10	30±4	10	194	19	116	10	8,0	0,7	145	
5	—	10	0	9	221	13	132	9	6,5	0,6	118	
5	1	10	19±4	9	211	15	126	9	9,1	0,6	165	
5	2	10	30 ±3	9	179	15	107	9	7,4	0,4	135	

[1] bedeutet: diese Pflanzen wurden nicht beimpft

Das Samengut war nach Angaben der Lieferfirma das übliche, gab aber sehr hohe und magere Sprosse. Die Trockengewichte der parallelen Serien liegen nur wenig, immerhin nach 5 Wochen signifikant, auseinander. Gegenüber der Kontrollserie enthalten die cobalaminbehandelten Pflanzen im gleichen Zeitpunkt 13 % mehr Stickstoff. Der günstigste Moment für den Nachweis des fixierten Luftstickstoffs dürfte somit nach 5 Wochen erreicht sein, wenn die Erbsenpflanzen zu blühen beginnen.

Da die Wurzeln, besonders der Leguminosen, auch stickstoffhaltige Verbindungen in den Boden bzw. die Nährlösung ausscheiden, musste kontrolliert werden, ob die gewonnenen Resultate tatsächlich den totalen Stickstoff repräsentierten. Zu diesem Zwecke wurden vom zuletzt beschriebenen Versuch pro Serie 5 Kolbeninhalte zusammengegossen und eingedampft. Der noch feuchte Rückstand wurde verascht und der Analyse unterworfen. Die pro Pflanze ausgeschiedenen Mengen Stickstoff betrugen nach 3, 4, 5 und 6 Wochen 0,047, 0,038, 0,052 und 0,042 mg bei

Tabelle 5

Pisum sativum. Trockengewicht und Stickstoffgehalt von 3 bis 6 Wochen alten Pflanzen. Cotyledonen nach 1 Woche abgeschnitten; Zugabe des Cyanocobalamins (100 mγ/ml) nach 2 Wochen

n	Alter in Wochen	Cyano-coba-lamin	Trockengewicht			P	Stickstoff			P
			mg	±s	%		mg	±s	%	
14	3	0	176	8	100		6,1	0,7	100	
13	3	+	176	12	100		6,1	0,6	100	
14	4	0	204	10	100		6,0	0,4	100	
15	4	+	215	10	105		6,3	0,5	103	
14	5	0	266	6	100	—	6,3	0,3	100	—
14	5	+	288	9	108	0,05	7,1	0,4	113	0,05
14	6	0	280	7	100		6,2	0,2	100	—
14	6	+	288	9	103		6,9	0,4	111	0,20

den cobalaminbehandelten und 0,056, 0,040, 0,040 und 0,050 mg bei den cobalaminfreien. Diese Beträge sind zu klein, als dass sie in der Bilanz berücksichtigt werden müssten.

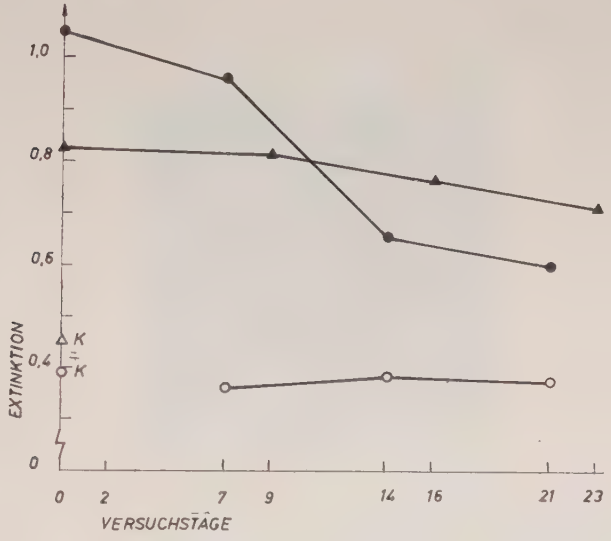
Konzentrationsänderungen des Cyanocobalamins in der Nährlösung

Die Arbeitshypothese setzte im Knöllchen eine konstante optimale Cobamidkonzentration voraus. Wird das Knöllchen ersetzt durch eine gewisse Cobalaminkonzentration um das ganze Wurzelsystem, so vermag die Erbsenpflanze Luftstickstoff zu fixieren. Obwohl das Anfangs-pH der verwendeten Nährlösung nach dem Sterilisieren 6,2 betrug und die Fernbachkolben vor Licht geschützt waren, war nicht zu erwarten, dass die anfängliche B_{12}-Konzentration über mehrere Wochen anhalte.

Durch den *Euglena*-Test wurde die Konzentrationsabnahme in Kulturlösungen und unbepflanzten Nährlösungen ermittelt. Als Vergleich wurden die Kulturlösungen cobalaminfrei gezogener Versuchspflanzen über die gleiche Zeitspanne mitgemessen. Alle Erbsen wurden aseptisch kultiviert und zeitlich gestaffelt gesetzt, damit ihre Kulturlösungen gleichzeitig untersucht werden konnten. Die Anfangskonzentration an Cobalamin betrug bei diesen Versuchen 50 mγ/ml. Für den *Euglena*-Test mussten die Lösungen aseptisch verdünnt werden, bis in den Röhrchen eine Konzentration von 5μγ ml vorhanden war. Die Inhalte von je 3 Fernbachkolben

einer Versuchsserie wurden aseptisch zusammengeschüttet, auf 600 ml aufgefüllt und dann verdünnt. Pro Bedingung wurden 3 Teströhrchen verwendet, ihre Inhalte vor dem Extrahieren jedoch vereinigt. Der ganze Test wurde doppelt geführt mit Proben aus 3 anderen Fernbachkolben.

Die Mittelwerte sind in Figur 7 dargestellt. Man vergleiche mit den Eichkurven in Figur 1. In bepflanzten Kolben nimmt die B_{12}-Konzentration rascher ab als in unbepflanzten. In cobalaminfreie Lösungen wird von den Wurzeln kein nachweisbares Vitamin B_{12} ausgeschieden.



Figur 7

Pisum sativum. Abnahme der Konzentration an Cyanocobalamin in den Kulturlösungen beziehungsweise in den unbepflanzten Nährlösungen

○K Kontrolle mit destilliertem Wasser

△K Kontrolle mit frischer B_{12}-freier Nährlösung

●——● Kulturlösung

▲——▲ unbepflanzte Nährlösung

○——○ cobalaminfreie Kulturlösung

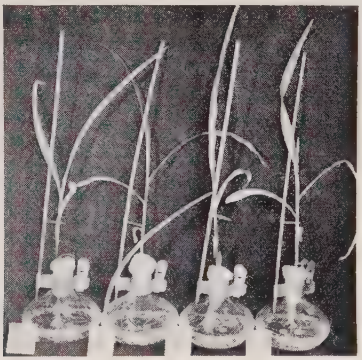
} Anfangskonzentration 100 mγ/ml

Die Wirkung von Cyanocobalamin auf Zea Mays L.

Die Tatsache, dass *Pisum sativum* als Vertreter der knöllchenbildenden Leguminosen bei Anwesenheit von Cyanocobalamin nichtsymbiotisch Luftstickstoff zu fixieren vermochte, berechtigt zur Frage, ob nicht auch Vertreter anderer Familien, die keine Knöllchen bilden, dazu imstande

wären, sofern man ihren Wurzelsystemen in geeigneter Weise Cobalamin zur Verfügung stellt.

Zea Mays, mit dessen aseptischer Aufzucht am hiesigen Institut ebenfalls schon Erfahrungen gesammelt worden waren, bildete zur Abklärung dieser erweiterten Hypothese ein günstiges Versuchsobjekt, da mit den gleichen Versuchseinrichtungen wie bei *Pisum* gearbeitet werden konnte. Zunächst wurden stickstofffreie Nährlösungen verschiedener Zusammensetzung erprobt. Kräftige, nichtchlorotische Maispflanzen wuchsen heran, wenn die für Erbsen angewandte Nährlösung auf ein Drittel verdünnt wurde (Figur 8). Der Eisenzusatz wurde auf 10 mg $FeCl_3$ pro Liter erhöht; zudem wurden pro Liter 50 γ $ZnSO_4 \cdot 2H_2O$ beigefügt.



Figur 8

Zea Mays. 4 Wochen alte Pflanzen auf stickstofffreier aseptischer Nährlösung. Man beachte, dass auch die Kontrollpflanzen (K) normal entwickelt sind. Mittelwerte aus Zehnerserien

K	ohne Cyanocobalamin
a	mit 50 mγ Cyanocobalamin pro ml
b	mit 150 mγ Cyanocobalamin pro ml
c	mit 450 mγ Cyanocobalamin pro ml

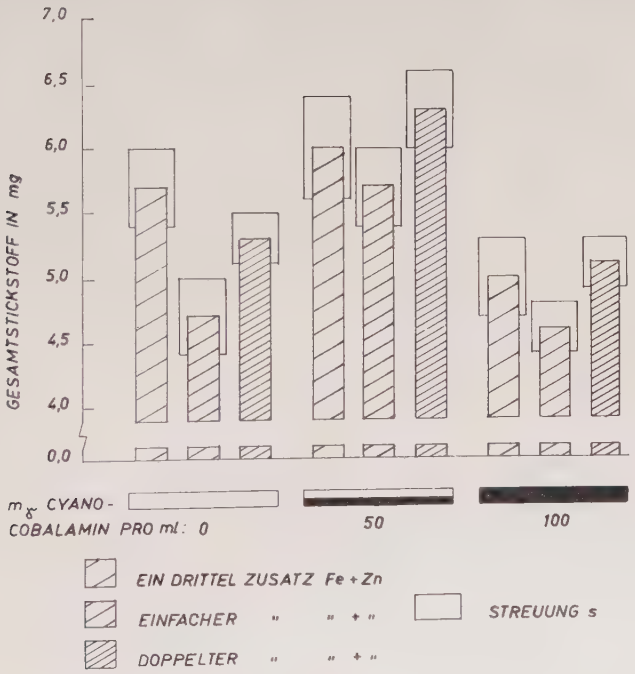
Maiskaryopsen oder Teile derselben sind unter aseptischen Bedingungen kaum von der Keimpflanze zu trennen. Man beliess sie daher der Pflanze und veraschte sie mit.

Tabelle 6 gibt die Resultate der zwei eindrücklichsten von fünf ähnlichen Versuchen wieder. Ausser einem unerwartet hohen Stickstoffanstieg bei relativ geringen B_{12}-Konzentrationen zeigte sich auch eine Auswirkung des Cobalamins auf das Längenwachstum: Die Sprosslängen der in Figur 8 abgebildeten, Mittelwerte repräsentierenden Pflanzen betragen, gemessen von der Karyopse bis zur obersten Blattspitze, für die Kontrolle 40 cm, für 50, 150 und 450 mγ B_{12}/ml 44, 50 und 45 cm.

Tabelle 6

Zea Mays. Trockengewicht und Stickstoffgehalt von 3 Wochen alten Pflanzen nach Zugabe verschiedener Mengen von Cyanocobalamin zur stickstofffreien Nährlösung nach 1 Woche

Serie	Cobalamin mγ/ml	n	Trockengewicht			P	n	Stickstoff			P
			mg	±s	%			mg	±s	%	
1	0	9	258	10	100	—	9	3,3	0,2	100	—
2	25	9	315	31	122	0,10	10	4,7	0,4	142	0,005
3	50	10	311	15	121	0,01	10	4,6	0,4	139	0,01
4	200	10	301	17	117	0,05	10	4,7	0,2	142	0,001
5	400	10	292	25	113	0,20	10	4,2	0,4	127	0,05
1	0	9	279	24	100	—	9	3,7	0,3	100	—
2	50	9	332	8	119	0,05	9	4,9	0,4	133	0,025
3	150	9	358	20	128	0,025	9	5,0	0,5	135	0,05



Figur 9

Zea Mays. Stickstoffgehalt von ganzen Pflanzen nach 4 Wochen aseptischer Kultur auf stickstofffreier Nährlösung. Zugabe des Cyanocobalamins nach 1 Woche. Es sind die Serienmittelwerte von je 10 Pflanzen aufgezeichnet

Einfacher Zusatz von Eisen: 10 mg Ferrichlorid pro Liter

Einfacher Zusatz von Zink: 50 mγ Zinksulfat pro Liter

Dass überdies die Elemente Eisen und Zink in einer Beziehung zur Assimilation des Luftstickstoffs stehen, zeigt Figur 9, aus der vor allem noch einmal der Anstieg des Gesamtstickstoffs bei 50 mγ B_{12}/ml entnommen werden kann.

Mit diesen Versuchen ist gezeigt, dass auch Mais bei Anwesenheit von Cyanocobalamin den Luftstickstoff zu verwerten vermag, dass dieser Effekt also nicht auf Leguminosen beschränkt ist.

Diskussion

Zum methodischen Teil

Die beschriebene Methode erlaubte es, mit relativ wenig Versuchspflanzen Serien zu bilden, die doch genügend sichere Informationen lieferten. Dadurch, dass die Samen einzeln zu Pflanzen herangezogen wurden, konnten gegenseitige Beeinflussungen ausgeschlossen werden. Nährlösungen vermögen zwar Böden nur bis zu einem gewissen Grade zu ersetzen, bei gewährleisteter Belüftung sind sie aber körnigen Ersatzböden,wie etwa Quarzsand oder Bentonit, dann vorzuziehen, wenn mit sehr geringen Konzentrationen eines Wirkstoffes gearbeitet werden muss. Als Versuchspflanze kam *Pisum sativum* in Frage als rasch wachsende Leguminose mit einem Samen, dessen nicht zu umfangreiche Grösse die Infektionsmöglichkeit minderte. Wenn dennoch, allerdings selten, Infektionen auftraten, wurden solche Pflanzen verworfen. Die Gewächshaustemperatur von 20° darf als günstig bezeichnet werden. Nach Meyer und Anderson (1959) wird die symbiotische Fixierung bei *Trifolium subterraneum* bei 30 °C stark gehemmt, weil bei erhöhter Atmung weniger Kohlenhydrate in die Knöllchen gelangen. Mes (1959) indessen erinnert an tropische und subtropische Leguminosen, bei denen die Verhältnisse anders liegen. Aprison et al. (1954) finden bei abgeschnittenen Knöllchen von Sojabohnen für die Fixation das Optimum bei 25 °C. Die Stickstoffreserven der Cotyledonen sind noch nicht erschöpft, wenn sie nach einer Woche der Pflanze weggenommen werden. Die Entfernung hatte im übrigen keinen nachteiligen Einfluss auf das Wachstum der Pflanzen. Früheres Abschneiden hätte allerdings einen schwerwiegenden Eingriff in den Stoffwechsel bedeutet (McAlister und Krober, 1951). Die Konzentration des Cyanocobalamins in den Nährlösungen entspricht grössenordnungsmässig der von Robbins et al. (1950) in frischen Wurzeln verschiedener Pflanzen gefundenen.

Zu den Ergebnissen

Unter den Spurenelementen galt Molybdän bis jetzt als die Stickstofffixierung am meisten fördernd (Mulder, 1948; Moore und Abaelu,

1959). Evans et al. (1950) erreichten damit an N-frei gezogener *Medicago sativa* einen signifikanten Anstieg des Trockengewichts und bis 92% mehr Stickstoff. Sie vermuteten das Element in der Dehydrogenase.

Erst kürzlich wurden Ergebnisse von Versuchen mit anorganischem Kobalt und Cyanocobalamin veröffentlicht. Ahmed und Evans (1960a,b) finden bei *Glycine* in hochgereinigter Nährlösung schon mit 1 p.p.b. Co die Trockensubstanz um 30% höher, wobei Kobalt als Cobalamin weniger wirksam sei denn als Ion. Die Autoren arbeiten jedoch nur mit symbiotischer Fixierung und finden den B_{12}-Gehalt in den Knöllchen nach Kobaltzugabe höher. Ihre Arbeitshypothese ist, dass die in Symbiose lebende Pflanze grösserer Kobaltgaben bedürfe als für sich allein. Sie schreiben die Wirkung dem Kobalt, nicht dem Cobalamin zu. Ihre Kontrollpflanzen sind völlig kobaltfrei gezogen. Deshalb ist ihre Schlussfolgerung, bei Kobaltzugabe mehr Stickstoff gefunden zu haben, eher in dem Sinne zu interpretieren, dass symbiotisch gezogene Sojabohnen bei totalem Kobaltmangel Stickstoffdefizite erleiden. Reisenauer (1960) findet gleiche Erscheinungen bei *Medicago sativa*. Dass Kobalt auch für *Rhizobium* allein essentiell ist, beschreiben Lowe, Evans und Ahmed (1960). In einem Medium mit Nitraten und Vitaminen bewirkten 0,5 p.p.b. Kobalt nach 5 bis 7 Tagen eine merkliche Vermehrung und einen viel grösseren Stickstoffgehalt gegenüber der Kontrolle. Delwiche, Johnson und Reisenauer (1961) beobachten in neuen Versuchen mit *Medicago* starken Anstieg des totalen Stickstoffs, wenn Kobalt zu symbiotisch lebenden Pflanzen gegeben wird. Sie können nicht folgern, wo das Ion seinen Effekt ausübe, glauben aber, dass dieser nicht mit der Rhizobien- oder Knöllchenvermehrung zusammenhänge, sondern eher mit der Synthese von Enzymen oder Coenzymen, die für die Reaktion nötig sind. Hallsworth et al. (1960) haben ähnliche Wirkungen mit Kobalt an *Trifolium subterraneum* erzielt.

Ohne vorläufig dem Vitamin B_{12} eine genauere Funktion zuzuordnen, kann man es als ein solches Coenzym betrachten; tatsächlich wird es von *Rhizobium* produziert (siehe Seite 358); Burton und Lochhead (1952) nennen 6 Species. Diese bilden es in grösserer Menge, wenn mehr Hefeextrakt und Aminosäuren vorhanden sind (*Rhizobium meliloti* stellt hierin eine Ausnahme dar). Kliewer und Evans (1962) fanden ähnliche Mengen von B_{12} (hier erstmals als «B_{12} coenzyme» bezeichnet) in den Knöllchen von Leguminosen, in *Alnus oregona*-Wurzelknöllchen und in einer Reinkultur von *Rhizobium meliloti*. In diesem Zusammenhang ist eine kürzlich erschienene Publikation von Bond und Hewitt (1962) besonders interessant, die beschreibt, dass in stickstofffreiem Medium *Alnus glutinosa*, kobaltfrei gezogen, gegenüber Versuchspflanzen mit sehr wenig Kobalt deutliche Stickstoffmangelerscheinungen aufweist. Von Iswaran et al. (1960) wird Vitamin B_{12} in Zusammenhang gebracht mit der Stickstoff-

fixierung durch *Azotobacter chroococcum*. Auf diesen Mikroorganismus ist Leguminosenhumusextrakt gegenüber anderen Humusextrakten wirksamer. Der Effekt wird aber zerstört durch Behandlung des Humus mit Wasserstoffperoxyd. Kobalt vermag zu stimulieren; in Mengen von 0,01 bis 0,1 p.p.m. als Vitamin B_{12} verabreicht, bewirkte es eine signifikante Stickstoffzunahme auch ohne Molybdän. Ein Mechanismus wird in der zitierten Arbeit nicht erwogen.

In den vorliegenden Versuchen wurde festgestellt, dass bei Zugabe von Cyanocobalamin zu aseptisch und stickstofffrei gezogenen Pflanzen von *Pisum sativum* und *Zea Mays* ein signifikanter Stickstoffanstieg resultiert. Daraus schliesse ich, dass Cyanocobalamin, eventuell in Verbindung mit einem von diesen höheren Pflanzen gebildeten Trägerprotein, zur Aufnahme, Aktivierung und Übertragung des molekularen Stickstoffs befähigt ist. Ist ein Protein beteiligt, etwa als Apoenzym, dann ist es nicht leguminosenspezifisch. Ältere Rhizobien können in Reinkultur bei Anwesenheit von Zuckern und anderen organischen Stoffen Vitamin B_{12} bilden. In Mischkultur mit *Euglena gracilis* oder in Symbiose mit Leguminosen werden ihnen diese organischen Stoffe vom photosynthetischen Organismus zugeführt. Statt Cyanocobalamin ist auch ein anderes Cobalamin denkbar, das in bezug auf die Aktivität ähnlich ist (Zygmunt, 1952).

Eine Pflanze, die von einer andern eine organische Substanz bezieht, lebt bezüglich dieser Substanz heterotroph. Überschneiden sich aber die Sphären der Exkretionsprodukte und die Bereiche, aus denen Stoffe bezogen werden, so dürfte, wenn irgendein gemeinsamer Stoffwechsel stattfindet, auch dann von einer Symbiose gesprochen werden, wenn keine morphologische Durchdringung erfolgt, wenn sogar eine gewisse räumliche Distanz die Organismen trennt. Wenn Watanabe (1950, 1959) bei Anwesenheit von blaugrünen Algen in Reiskulturen eine Stickstoffixierung feststellt, so kann angenommen werden, dass diese Algen mittels eines Enzyms Luftstickstoff gebunden haben und dass ihre stickstoffhaltigen Ausscheidungsprodukte dem Reis zur Verfügung standen. Ebensogut kann von den Algen aber Vitamin B_{12} ausgeschieden worden und die Fixierung in den unterirdischen Teilen der Reispflanze erfolgt sein. Chakraborty und Sen Gupta (1959) erhalten denn auch noch eine Stickstoffixierung durch Reis, wenn die Algen entfernt wurden.

Dass Vitamin B_{12} von den Rhizobien ausgeschieden wird, ergaben eigene Testversuche mit *Euglena*. Dass die Stickstoffixation im Zellsaft der Knöllchen, nicht in den Bakteroiden oder dem Gewebe erfolgt, haben Turchin (1959) und Bergersen (1960) gezeigt. J. D. Smith (1949) fand das Leghämoglobin in den Zellen und nicht in den Bakteroiden; dass es in den stickstoffixierenden Organismen *Nostoc*, *Azotobacter* und *Clostridium* nicht vorkommt, berichtete Virtanen (1948).

Wenn nichtspezifische, freilebende Rhizobien, ohne Knöllchen zu bilden, den Stickstoffgehalt von Leguminosen positiv zu beeinflussen vermögen (Krasilnikov und Aseyeva, 1959), so kann es sich auch hier um einen Fall von «Distanzsymbiose» handeln. Das Vitamin B_{12} der Rhizobien (Burton und Lochhead, 1952; Malinska und Pedziwilk, 1958), unter Anwesenheit von Leguminosenausscheidungen entstanden, kann in den Wurzeln der Leguminosen wirksam geworden sein. Leider schlugen meine bisherigen Versuche, die Rhizobien durch Dialysiermembranen von den Leguminosenwurzeln fernzuhalten, wegen der Kleinheit der Bakterien fehl. Diese drangen nämlich in so grosser Zahl durch die Membranen, dass sogar Wurzelknöllchen entstanden. Es müsste aber überprüft werden, ob bei Anwesenheit nichtspezifischer oder ineffektiver Rhizobien in den Nährlösungen Cobalamine auftreten.

Wenn Schanderl (1943) verallgemeinernd allen höheren Pflanzen die Fähigkeit, molekularen Stickstoff zu fixieren, zuspricht – und deswegen von Allen und Allen (1950) als *miserabile vulgus* getadelt wird –, so mag in seinen Versuchen, die nicht steril durchgeführt worden sind, die Anwesenheit eines durch Mikroben ausgeschiedenen Wirkstoffes, etwa Vitamin B_{12}, mitgespielt haben[1]. Da viele Mikroorganismen Vitamin B_{12} produzieren (Darken, 1953), andererseits eine grosse Zahl von Bodenbakterien seiner bedürfen (Lochhead und Thexton, 1951, 1952; Lochhead und Burton, 1956; Lochhead, 1958), ist sein Vorkommen im Boden sicher weit verbreitet. Man darf sich daher fragen, ob es nicht allgemein, nach Taxa jedoch verschieden stark, von Wurzeln aufgenommen und der Stickstoffixation dienstbar gemacht wird. Exakte Feldversuche mit Pflanzen- und Bodenanalysen wären zur Abklärung dieser Fragen wertvoll, besonders auch in Hinsicht auf eine eventuelle künstliche Anreicherung der Böden an Vitamin B_{12}.

Shields (1953) gibt eine Liste von Arbeiten über N-fixierende Mikroorganismen, höhere Pflanzen und Symbionten. Sie zitiert unter anderen Nath (1940), der Stickstoffixation bei *Zea Mays* gefunden hat. Meine Beobachtung, dass Eisen an der Stickstoffixierung durch Mais beteiligt ist, deckt sich mit der Feststellung von Proctor und Wilson (1958), dass *Pseudomonas* und *Achromobacter* mehr Eisen für die Fixation brauchen, wenn keine andere Stickstoffquelle vorhanden ist.

Wenn auch nur bedingt von einem einzigen stickstoffixierenden Enzymsystem gesprochen werden kann, so ist doch auffällig, dass die Reaktion

[1] Wie schon geringste Spuren dieses Vitamins wirksam sind, zeigt die Erfahrungstatsache, dass destilliertes Wasser, nach üblichen Methoden nur eine halbe Stunde autoklaviert, oder Teströhrchen, wenn nicht alkalisch ausgekocht, Mengen enthalten, die das Wachstum von *Euglena* bereits beeinflussen. Eine starke Wachstumssteigerung wird bei dieser Alge schon durch einen B_{12}-Zusatz von $0{,}5 \cdot 10^{-12}$ g/ml hervorgerufen (Figur 1).

bei verschiedenartigen Organismen durch gleiche Einflüsse gehemmt werden kann (Wyss et al., 1941; Burris und Wilson, 1946; Hoch et al., 1957; Bond, 1960; Goerz und Pengra, 1961).

In den zusammenfassenden Arbeiten von Wilson (1940) und Fedorow (1952) bleibt der erste Schritt der Reaktionskette noch ungeklärt. Auch aus der soeben erschienenen Rückschau auf die Literatur der letzten Jahre (Raggio und Raggio, 1962) geht nicht hervor, dass eine zwingende Formulierung gefunden worden wäre. Allgemein neigt man heute zur Annahme, das Primärprodukt sei Ammoniak (Wilson und Burris, 1947; Zelitch, Wilson und Burris, 1952; Bergersen, 1959). Auch aus den vorliegenden Versuchsergebnissen ist es nicht möglich, einen Mechanismus abzuleiten. Allison et al. (1940a, b) fanden, dass das Innere der Knöllchen unter (fast) anaeroben Bedingungen stehe. Bauer (1960) konstruiert einen Mechanismus, bei dem sowohl aerobe wie anaerobe Regionen des Knöllchens berücksichtigt werden. Er schlägt vor, als erste Schritte anzunehmen: Aktivierung des Stickstoffmoleküls an Legoglobin (seine Bezeichnung für Leghämoglobin) unter gleichzeitiger Entwicklung von Wasserstoff. Direkte oder indirekte Vereinigung von Stickstoff (aktiviert) und Wasserstoff (radikal) zu N_2H bis N_2H_n. Wenn dabei N_2H_4 entsteht, würde es durch ein Molybdoflavoprotein zu 2 NH_3 reduziert. "Eventually, of course, it should be possible to find conditions for the fixing of nitrogen through the mediation of a protein molecule having properties at least very similar to those of the legoglobins."

Es bestehen viele Anzeichen dafür, dass Vitamin B_{12} in Verbindung mit einem Trägerprotein einen solchen Vermittler darstellt, der sowohl bei Anwesenheit wie auch beim Fehlen von Leghämoglobin als Fixationsenzym angesprochen werden darf.

Zusammenfassung

1. Es wurde der Einfluss von Cyanocobalamin auf die Aufnahme des Luftstickstoffs durch *Pisum sativum* L. und *Zea Mays* L. untersucht. *Pisum* wurde sowohl symbiotisch mit *Rhizobium leguminosarum* wie auch aseptisch gezogen.

2. Die Versuchspflanzen wurden auf steriler stickstofffreier Nährlösung kultiviert. Den *Pisum*-Pflanzen wurden die Cotyledonen als Stickstoffreserven abgeschnitten. Alle Operationen bis zum Versuchsabbruch erfolgten unter aseptischen Bedingungen.

3. Die Konzentration des Cyanocobalamins in der Nährlösung wurde während der Versuchsdauer mittels der *Euglena*-Methode (*Euglena gra-*

cilis var. *bacillaris)* kontrolliert. Ferner wurde untersucht, ob *Rhizobium* Vitamin B_{12} produziere oder es für das Wachstum benötige.

4. Ältere Rhizobien produzierten in Mischkultur mit *Euglena gracilis* Vitamin B_{12}; jüngere produzierten es erst, wenn etwas B_{12} zugefügt wurde.

5. Für die Reinkultur von Rhizobien vermochte Cyanocobalamin den Hefeextrakt nicht zu ersetzen.

6. Der totale Stickstoffgehalt der aseptischen *Pisum*-Pflanzen konnte bei einem Zusatz von 50 mγ B_{12} pro ml Nährlösung um 14% ($P = 0{,}02$) bis 17% ($P = 0{,}05$) gesteigert werden. Unter gleichen Umweltsbedingungen betrug die Stickstoffzunahme bei symbiotischer Fixierung 25% ($P = 0{,}025$). Aseptische *Pisum*-Pflanzen ergaben in einem anderen Versuch bei 50 mγ B_{12}/ml einen Stickstoffgewinn von 34% ($P = 0{,}025$).

7. Der totale Stickstoffgehalt von *Zea Mays* stieg bei einem Zusatz von 25 mγ B_{12} pro ml um 42% ($P = 0{,}005$). Cyanocobalamin wirkte sich hier auch auf das Längenwachstum aus.

8. Die Konzentration an Vitamin B_{12} nahm in der angewandten sterilen Nährlösung mit der Zeit schwach ab, stärker jedoch, wenn eine *Pisum*-Pflanze darauf wuchs. Aseptisch kultivierte Erbsenwurzeln schieden kein mikrobiologisch nachweisbares Vitamin B_{12} aus.

9. Dem Cyanocobalamin wird auf Grund der durchgeführten Versuche eine wesentliche Beteiligung am ersten Schritt der Stickstoffixierung bei Leguminosen und Nichtleguminosen zugeschrieben.

10. In der Diskussion wird die Schlussfolgerung in Beziehung gebracht zu teilweise ungeklärten Beobachtungen über die Stickstoffixierung bei Nichtleguminosen, indem die Möglichkeit einer «Symbiose auf Distanz» (ohne morphologische Durchdringung) erwogen wird.

Die vorliegende Arbeit wurde im Botanischen Institut der Universität Basel bei Herrn Prof. Dr. Max Geiger-Huber durchgeführt. Für sein Interesse an meiner Arbeit und dafür, dass er mir Instrumente, Material und Hilfskräfte in grosszügiger Weise zur Verfügung stellte, möchte ich ihm herzlich danken. Weiterhin danke ich der technischen Angestellten Frl. Edith Rudin für ihre Mitarbeit bei den Cobalaminbestimmungen, sowie den Lehrlaborantinnen Frau S. Bowald, Frl. E. Daniel, Frl. S. Labhard, Frl. I. Mähling und Frl. M. Petersen für ihre Mithilfe bei der aseptischen Aufzucht und den Stickstoffbestimmungen.

Ahmed S., Evans H. J. 1960. Cobalt: A Micronutrient Element for the Growth of Soybean Plants under Symbiotic Conditions. Soil Sci. **90**, 205–210.

— — 1960. The Response of Soybean Plants in the Absence of Supplied Nitrogen. Plant Physiol. **35**, XXIV–XXV.

Allen E. K., Allen O. N. 1950. Biochemical and Symbiotic Properties of *Rhizobia*. Bact. Revs. **14**, 273–330.

— — 1958. Biological Aspects of Symbiotic Nitrogen Fixation. In: Handbuch der Pflanzenphysiologie **8**, 48–118. Springer, Göttingen.

Allison F. E. 1930. Can Nodule Bacteria of Leguminous Plants Fix Atmospheric Nitrogen in the Absence of the Host ? Jour. Agr. Res. **39**, 893–924.

— 1935. Carbohydrate Supply as a Primary Factor in Legume Symbiosis. Soil Sci. **39**, 123–143.

— Ludwig C. A., Hoover S. R., Minor F. W. 1940. Biochemical Nitrogen Studies. I. Evidence for Limited Oxygen Supply within the Nodule. Bot. Gaz. **101**, 513–533.

— — — — 1940. II. Comparative Respiration of Nodule and Roots, including Non-legume Roots. Bot. Gaz. **101**, 543–549.

Aprison M. H., Burris R. H. 1952. Time Course of Fixation of N_2 by Excised Soybean Nodules. Science **115**, 264–265.

— Magee W. E., Burris R. H. 1954. Nitrogen Fixation by Excised Soybean Root Nodules. Jour. Biol. Chem. **208**, 29–39.

Bach M. K., Magee W. E., Burris R. H. 1958. Translocation of Photosynthetic Products to Soybean Nodules and there Role in Nitrogen Fixation. Plant Physiol. **33**, 118–124.

Bauer N. 1960. A Probable Free-radical Mechanism for Symbiotic Nitrogen Fixation. Nature **188**, 471–473.

Bergersen F. J. 1959. Biochemical Pathways in Legume Root Nodule Nitrogen Fixation. Bact. Revs. **24**, 246–250.

— 1960. Incorporation of N^{15}_2 into Fractions of Soybean Root Nodules. Jour. Gen. Microbiol. **22**, 671–677.

Bond G. 1960. Inhibition of Nitrogen Fixation in Non-legume Root Nodules by Hydrogen and Carbon Monoxyde. Jour. Exptl. Bot. **11**, 91–97.

— Hewitt E. J. 1962. Cobalt and the Fixation by Root Nodules of *Alnus* and *Casuarina*. Nature **195**, 94–95.

Boussingault I. 1838. Recherches chimiques sur la végétation entreprises dans le but d'examiner si les plantes prennent de l'azote de l'atmosphère. Ann. de chim. et de phys. **67**, 1–54.

Bürgin-Wolff Annemarie. 1959. Untersuchungen über die Infektion von Wurzeln durch Knöllchenbakterien. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **69**, 75–111 (Diss. Basel).

Burk D., Burris R. H. 1941. Biochemical Nitrogen Fixation. Ann. Rev. Biochem. **10**, 587–618.

Burlet E. 1940. Über die pflanzliche Organkultur und ihre Anwendung bei physiologischen Untersuchungen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **50**, 519–544 (Diss. Basel).

Burris R. H., Eppling F. J., Wahlin H. B., Wilson P. W. 1943. Detection of Nitrogen Fixation with Isotopic Nitrogen. Jour. Biol. Sci. **143**, 349–357.

— Wilson P. W. 1945. Biological Nitrogen Fixation. Ann. Rev. Biochem. **14**, 685–708.

— — 1946. Characteristics of the Nitrogen-fixing Enzyme System in *Nostoc Muscorum*. Bot. Gaz. **108**, 254–262.

Burton Margaret O., Lochhead A. G. 1952. Production of Vitamin B_{12} by *Rhizobium* species. Canad. Jour. Bot. **30,** 521–524.

Chakraborty S. P., Sen Gupta S. P. 1959. Fixation of Nitrogen by the Rice Plant. Nature **184,** 2033–2034.

Darken Marjorie A. 1953. Production of Vitamin B_{12} by Microorganisms and its Occurence in Plant Tissues. The Bot. Review **19,** 99–130.

Delwiche C. C., Johnson C. M., Reisenauer H. M. 1961. Influence of Cobalt on Nitrogen Fixation by *Medicago*. Plant Physiol. **36,** 73–78.

Duda J., Pedziwilk Z., Zodrow K. 1957. Studies on the Vitamin B_{12} Content of the Leguminous Plants. Acta Microbiol. Polonica **6,** 233–238.

Ellfolk N. 1959. Crystalline Leghaemoglobin. Acta Chem. Scand. **13,** 596–597.

— 1960. Crystalline Leghaemoglobin. I. Purification Procedure. Acta Chem. Scand. **14,** 609–616.

— 1960. Crystalline Leghaemoglobin. II. The Molecular Weights and Shapes of the Two Main Components. Acta Chem. Scand. **14,** 1819–1827.

Evans H. J., Purvis E. R., Bear F. E. 1950. Molybdenum Nutrition of Alfalfa. Plant Physiol. **25,** 555–566.

Fedorow M. W. 1952. Biologische Bindung des atmosphärischen Stickstoffs. Übers.: VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1960.

Fisher R. A. 1945. Statistical Methods for Research Workers. 10. Aufl. Oliver and Boyd, Edinburgh.

— Yates F. 1948. Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research. 3. Aufl. Oliver and Boyd, Edinburgh.

Ford J. E., Hutner S. H. 1955. Role of Vitamin B_{12} in the Metabolism of Microorganisms. Vitamins and Hormones **13,** 101–136.

Fries Lisbeth. 1962. Vitamin B_{12} in *Pisum sativum*. Physiol. Plant. **15,** 566–571.

Frost D. V., Lapidus M., Plaut K. A., Scherfling E., Fricke H. H. 1952. Differential Stability of Various Analogs of Cobalamin to Vitamin C. Science **115,** 119–121.

Gest H., Kamen M. D., Bregoff H. M. 1950. Studies on the Metabolism of Photosynthetic Bacteria. V. Photoproduction of Hydrogen and Nitrogen Fixation by *Rhodospirillum rubrum*. Jour. Biol. Chem. **182,** 153–170.

Goerz R. D., Pengra R. M. 1961. Physiology of Nitrogen Fixation by a Species of *Achromobacter*. Jour. Bact. **81,** 568–572.

Hallsworth E. G., Wilson S. B., Greenwood E. A. N. 1960. Copper and Cobalt in Nitrogen Fixation. Nature **187,** 79–80.

Harris G. P., Morrison T. M. 1958. Fixation of Nitrogen-15 by Excised Nodules of *Coriaria arborea* Lindsay. Nature **182,** 1812.

Heinrich H. C. (Herausg.). 1957. Vitamin B_{12} and Intrinsic Factor (1. Europ. Symposium). F. Enke-Verlag, Stuttgart.

Hellriegel H., Willfarth H. 1889. Erfolgt die Assimilation des freien Stickstoffs durch Leguminosen unter Mitwirkung niederer Organismen? Ber. Deutsch. Bot. Ges. **7,** 133–143.

Hérisset A. 1946. Fixation de l'azote par le *Nostoc commune* Vaucher. Compt. Rend. Acad. Sci. **222,** 1127–1129.

Hoch G. E., Little H. N., Burris R. H. 1957. Hydrogen Evolution from Soybean Root Nodules. Nature **179,** 430–431.

Holm-Hansen O., Gerloff G. C., Skoog F. 1954. Cobalt as an Essential Element for Blue-Green Algae. Physiol. Plant. **7,** 665–675.

Hopkins E. W. 1929. Studies of Nitrogen Fixation by the Root Nodule Bacteria of the Leguminosae. Soil Sci. **28**, 433–447.

Iswaran V., Sundara Rao W. V. B., Mathur S. P. 1960. Role of Vitamin B_{12} in Nitrogen-Fixation by *Azotobacter chroococcum*. Current Sci. **29**, 63–64.

Jensen H. L., De Roma Bhattacharya P. K. 1959. A New Nitrogen-Fixing Bacterium. Nature **184**, 1743.

Kamen M. D., Gest H. 1949. Evidence for a Nitrogenase System in the Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum*. Science **109**, 560.

Keilin D., Wang Y. L. 1945. Haemoglobin in the Root Nodules of Leguminous Plants. Nature **155**, 227–229.

— Smith J. D. 1947. Haemoglobin and Nitrogen Fixation in the Root Nodules of Leguminous Plants. Nature **159**, 692–694.

Kliewer M., Evans H. J. 1962. B_{12}-Coenzyme Content of the Nodule from Legumes, Alder and of *Rhizobium meliloti*. Nature **194**, 108–109.

Krasilnikov N. A., Aseyeva I. V. 1959. The Influence of Soil Bacteria on the Free Amino Acid Content of Papilionaceous Plants. Folia Microbiol. **4**, 45–50 (Abstr.).

Kubo H. 1939. Über Hämoprotein aus den Wurzelknöllchen von Leguminosen. (Vorl. Mitt.) Acta Phytochim. (Tokyo) **11**, 195–200.

Lieb H. 1931. Bestimmung des Stickstoffs. In Klein G. 1931. Allgemeine Methoden der Pflanzenanalyse. Jul. Springer, Wien.

Lindstrom E. S., Burris R. H., Wilson P. W. 1949. Nitrogen Fixation by Photosynthetic Bacteria. Jour. Bacteriol. **58**, 313–315.

— Newton J. W., Wilson P. W. 1952. The Relationship between Photosynthesis and Nitrogen Fixation. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **38**, 392–396.

Lochhead A. G. 1958. Soil Bacteria and Growth-Promoting Substances. Bact. Revs. **22**, 145–153.

— Thexton R. H. 1951. Vitamin B_{12} as a Growth Factor for Soil Bacteria. Nature **167**, 1034.

— — 1952. Qualitative Studies of Soil Microorganisms. X. Bacteria Requiring Vitamin B_{12} as Growth Factor. Jour. Bacteriol. **63**, 219–226.

— Burton Margaret O. 1956. Incidence in Soil of Bacteria Requiring Vitamin B_{12} and the Terregens Factor. Soil Sci. **82**, 237–245.

Löhnis Marie P. 1930. Can *Bacterium radicicola* Assimilate Nitrogen in the Absence of the Host Plant? Soil Sci. **29**, 37–57.

Lowe R. H., Evans H. J., Ahmed S. 1960. The Effect of Cobalt on the Growth of *Rhizobium japonicum*. Biochem. and Biophys. Res. Comm. **3**, 675–678.

Magee W. E., Burris R. H. 1954. Fixation of N^{15}_2 by Excised Root Nodules. Plant Physiol. **29**, 199–200.

Malinska E., Pedziwilk Z. 1958. Studies on Synthesis and Composition of Cobalamins in *Rhizobium* (II). Acta Microbiol. Polonica **7**, 125–130.

McAlister D. F., Krober O. A. 1951. Translocation of Food Reserves from Soybean Cotyledons and their Influence on the Development of the Plant. Plant Physiol. **26**, 525–538.

Mes Margareta M. 1959. Influence of Temperature on the Symbiotic Nitrogen Fixation of Legumes. Nature **184**, 2032–2033.

Meyer D. R., Anderson A. J. 1959. Temperature and Symbiotic Nitrogen Fixation. Nature **183**, 61.

Moore A. W., Abaelu J. N. 1959. Non-symbiotic Nitrogen Fixation in a Soil of the Nigerian Rain-Forest Zone. Nature **184,** 75.

Morrison T. M. 1961. Fixation of Nitrogen-15 by Excised Nodules of *Discaria toumatou*. Nature **189,** 945.

Mulder E. G. 1948. Importance of Molybdenum in the Nitrogen Metabolism of Microorganisms and Higher Plants. Plant and Soil **1,** 94–119.

Nath B. V. 1940. Reports of the Imperial Agricultural Chemist. Imp. Agr. Res. Inst. New Delhi Sci. Rep. 1938–1939, 83–102 (zit. in Shields, 1953).

Nemeth Gy. 1959. A New Nitrogen-fixing Microorganism Producing a Red Pigment. Nature **182,** 1461.

Nicholas D. J. D. 1957. The Function of Trace Metals in the Nitrogen Metabolism of Plants. Ann. Bot. **21,** 507–598.

Niss H. F., Wilson P. W. 1947. Haemoprotein from Root Nodules and Nitrogen Fixation by *Rhizobium*. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **66,** 233–235.

Parnas J. K. 1938. Über die Ausführung der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl in der Modifikation von Parnas und Wagner. Zeitschr. f. analyt. Chemie **114,** 261–275.

Pate J. S. 1958. Nodulation Studies in Legumes. I. The Synchronization of Host and Symbiotic Development in the Field Pea, *Pisum arvense L.* Austral. Jour. Biol. Sci. **11,** 366-381.

— 1958. Nodulation Studies in Legumes. II. The Influence of Various Environmental Factors on Symbiotic Expression in the Vetch *(Vicic sativa L.)* and other Legumes. Austral. Jour. Biol. Sci. **11,** 496–515.

Pratt D. C., Frenkel A. W. 1959. Studies on Nitrogen Fixation and Photosynthesis of *Rhodospirillum rubrum*. Plant Physiol. **34,** 333–337.

Proctor M. H., Wilson P. W. 1958. Nitrogen Fixation by Gram-Negative Bacteria. Nature **182,** 891.

Raggio M., Raggio Nora. 1956. A New Method for the Cultivation of Isolated Roots. Physiol. Plantarum **9,** 466–469.

— — 1962. Root Nodules. Ann. Rev. Plant. Physiol. **13,** 109–128.

— — Torrey J. G. 1957. The Nodulation of Isolated Leguminous Roots. Amer. Jour. Bot. **44,** 325–334.

— — Burris R. H. 1959. Enhancement by Inositol of the Nodulation of Excised Bean Roots. Science **129,** 211–212.

Reisenauer H. M. 1960. Cobalt in Nitrogen Fixation by a Legume. Nature **186,** 375–376.

Robbins W. J., Hervey Anette, Stebbins Mary E. 1950. Studies on *Euglena* and Vitamin B_{12}. Science **112,** 455.

Rudin P. 1956. Versuche zur Physiologie der Knöllchenbildung bei *Pisum sativum L.* Phytopath. Zeitschr. **26,** 57–80 (Diss. Basel).

Schanderl H. 1943. Untersuchungen über den Stickstoffhaushalt von Nichtleguminosen und Leguminosen. Planta **33,** 424–457.

Shields Lora M. 1953. Nitrogen Sources of Seed Plants and Environmental Influences Affecting Nitrogen Supply. The Bot. Review **19,** 321–376.

Smith E. L. 1960. Vitamin B_{12}. Methuen & Co. Ltd., London.

Smith J. D. 1949. The Concentration and Distribution of Haemoglobin in the Root Nodules of Leguminous Plants. Biochem. Jour. **44,** 585–591.

Stevenson Greta. 1958. Nitrogen Fixation by Non-Nodulated Plants and by Nodulated *Coriaria arborea*. Nature **182,** 1523–1524.

— 1959. Fixation by Non-Nodulated Seed Plants. Ann. Bot. **23,** 622–635.

Symposium 1956. Siehe Heinrich, 1957.

Thölen H., Pletscher A. 1953. Vitamin B_{12}-Bestimmung für klinische Zwecke. Acta haematologica **10**, 186–190.

Turchin F. V. 1959. New Data on the Fixation of Atmospheric Nitrogen in the Nodules of Legumes. Soviet Soil Sci. 1961, 1141–1149 (engl. Übersetzung aus Pochvovedenije 1959, **10**, 14–24).

Vergil. Landleben, Georgica I. Tusculum-Bücherei, Ernst Heimeran, München, 2. Aufl. 1953, S. 62/63.

Virtanen A. I. 1945. Symbiotic Nitrogen Fixation. Nature **155**, 747–748.

— 1947. The Biology and Chemistry of Nitrogen Fixation by Legume Bacteria. Biol. Rev. **22**, 239–269.

— 1948. Biological Nitrogen Fixation. Ann. Rev. Microbiol. **2**, 485–506.

— Laine T. 1946. Red, Brown and Green Pigments in Leguminous Root Nodules. Nature **157**, 25–26.

— Jorma I., Linkola H., Linnasalmi A. 1947. On the Relation between N-Fixation and Leghaemoglobin Content of Leguminous Root Nodules. Acta Chem. Scand. **1**, 90–110.

— Erkama I., Linkola H. 1947. On the Relation between Nitrogen Fixation and Leghaemoglobin Content of Leguminous Root Nodules. Acta Chem. Scand. **1**, 861–870.

— Moisio T., Burris R. H. 1955. Fixation of Nitrogen by Nodules Excised from Illuminated and Darkened Pea Plants. Acta Chem. Scand. **9**, 184–186.

Watanabe A. 1950. Studies on the Fixation of Atmospheric Nitrogen by Blue-Green Algae (V). On the Effect of the Atmospheric Nitrogen Blue-Green Algae on the Growth of Rice Plant. Misc. Reports Res. Inst. Nat. Res. **17–18**, 61–68 (japanisch mit englischer Zusammenfassung).

— 1959. Collection and Cultivation of Nitrogen-Fixing Blue-Green Algae and their Effect on the Growth and Crop Yield of Rice Plants. Stud. Tokugawa Inst. **9** (1961), 162–166.

Wilson P. W. 1940. The Biochemistry of Nitrogen Fixation. Univ. Wisconsin Press, Madison.

— Fred E. B., Salmon M. R. 1933. Relation between CO_2 and Elemental N-Assimilation in Leguminous Plants. Soil Sci. **35**, 145–165.

— Burris R. H. 1947. The Mechanism of Biological Nitrogen Fixation. Bact. Revs. **11**, 41–73.

Wyss O., Lind C. J., Wilson J. B., Wilson P. W. 1941. Mechanism of Biological Nitrogen Fixation. VII. Molecular H_2 and the pH_2 Function of *Azotobacter*. Biochem. Jour. **35**, 845–854.

Zelitch I., Wilson P. W., Burris R. H. 1952. The Amino Acid Composition and Distribution of N^{15} in Soybean Root Nodules Supplied N^{15}-Enriched N_2. Plant Physiol. **27**, 1–8.

Zygmunt W. A. 1952. Microbiological Activity of Analogues of Vitamin B_{12} by the Cup Plate Method. Jour. Bacteriol. **63**, 821–822.

Curriculum vitae

Am 30. Juli 1932 wurde ich, Ernst Peter Müller, als Sohn des Traugott Müller († 1959), Bankbeamter, und der Klara, geb. Matter, beide Bürger von Muhen (Aargau), in Rheinfelden geboren. Ich besuchte die Primarschule in Wohlen (Aargau), die Bezirks- und die Kantonsschule in Aarau, wo ich 1953 die Maturitätsprüfung Typus B ablegte. Nach einem viermonatigen Volontariat in einem wissenschaftlichen Laboratorium absolvierte ich an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich den Normalstudienplan der Abteilung X für Naturwissenschaften mit Hauptrichtung Chemie und Physik. Dabei legte ich die zwei Vordiplomprüfungen in den Fächern Mathematik, Chemie, allg. Botanik, Mineralogie, Geologie und Geographie ab. Im Herbst 1958 immatrikulierte ich mich an der Universität Basel, wo ich vorwiegend biologische Fächer studierte. Hier legte ich auch zwei Nebenfachexamina in Chemie (Prof. H. Erlenmeyer) und physikalischer Chemie (Prof. W. Kuhn) ab, während mir eine dritte Prüfung erlassen wurde. Im Schuljahr 1958/59 bekleidete ich eine Hilfslehrerstelle für Chemie an der Kantonsschule Aarau. Neben der Arbeit für meine Dissertation bei Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber erteilte ich als Vikar Unterricht am Mädchengymnasium in Basel.

Während meiner Studienzeit besuchte ich hauptsächlich die Vorlesungen, Kurse, Übungen, Praktika und Exkursionen folgender Professoren und Dozenten:

An der ETH: C. Burri, A. Frey-Wyssling, E. Gäumann, H. Gutersohn, A. Guyer, W. Koch †, F. Laves, C. Martius, R. Parker, A. Pfluger, V. Prelog, L. Ruzicka, W. Saxer, P. Scherrer, G. Schwarzenbach, J. Seiler, R. Staub †, W. D. Treadwell †, R. Trümpy, G. Trümpler und T. O. Wiken.

In Basel: E. Batschelet, M. Geiger-Huber, H. Nüesch, A. Portmann, J. Tomcsik, W. Vischer † und H. Zoller.

Allen meinen Lehrern spreche ich an dieser Stelle meinen besten Dank aus.